Mechanismen der Persistenz von *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydophila pneumoniae* in humanen monozytären und epithelialen Zellen

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Biol. Birgit Kraußе-Opatz
geboren am 2.1.1964
in Hannover

2003

Referent:	Prof. Dr. W. Müller
Korreferent:	Prof. Dr. H. Zeidler
Tag der Promotion:	21.11.2003

Für Lea und Saskia

Zusammenfassung

Chlamydia trachomatis (CT) und *Chlamydophila pneumoniae (CP)* sind obligat intrazelluläre Bakterien, die chronische Entzündungsreaktionen durch persistierende i.e. kulturnegative Infektionen vitaler metabolisch aktiver Erreger auslösen können. Sowohl epitheliale als auch monozytäre Zellen sind wichtige Wirtszellen für Chlamydien, wobei den monozytären Zellen eine zentrale Rolle in der Erregerdissimination und chlamydialen Persistenz zukommt.
Ein Problem bei der Untersuchung chlamydialer Infektionen *in vitro* stellt die häufige Mycoplasmen-Kontamination chlamydialer Stämme dar.
In den hier vorgelegten Untersuchungen sollten 1. die Rate mycoplasmaler Kontaminationen in *CT* und *CP*-Stämmen bestimmt, die biologischen Effekte auf chlamydiale Infektionen untersucht und eine selektive Dekontamination von Mycoplasmen angestrebt werden, 2. mögliche Mechanismen der chlamydialen Persistenz *in vitro* und 3. die während persistierender chlamydialer Infektionen in Monozyten generierten Entzündungsmediatoren untersucht werden.

1. Neun *CT*- und 17 *CP*-Stämme wurden mit Hilfe einer Breitspektrum-nested-PCR auf mycoplasmale Kontamination untersucht. Die Spezifität der PCR- wurde durch einen neu entwickelten Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Hpa*I und Sequenzierung einiger PCR-Produkte verifiziert. 5/9 *CT*-Stämmen und 6/17 *CP*-Stämmen waren mit Mycoplasmen i. e. *Mycoplasma fermentans*, *M. hyorhinis* und *M. hominis* kontaminiert. In Versuchen zur biologischen Relevanz mycoplasmaler Kontaminationen in Chlamydien-Kulturen zeigte sich eine von der Anzahl anwesender Mycoplasmen abhängige Suppression der Entwicklung chlamydialer Einschlusskörper bis zum kompletten Wachstumsstopp. Mycoplasmen wurden mit Hilfe einer neu entwickelten Methode durch Behandlung mit dem Antibiotikum Mupirocin aus Chlamydien-Kulturen eliminiert. Ein klinisches Isolat von *CP* wurde durch diese Behandlung von einer *M. hyorhinis*-Kontamination gereinigt.
2. In Versuchen zur Persistenz von *CT* in monozytären THP-1- und epithelialen HEp-2-Zellen wurde eine IFNγ-induzierte Suppression der Einschlusskörper-Entwicklung festgestellt. Freie Eisen-II-Ionen heben die IFNγ-induzierte Wachstumshemmung in HEp-2-Zellen vollständig und in THP-1-Zellen partiell auf. In *CT*-infizierten humanen peripheren Blutmonozyten (HPBM) hat der Zusatz freier Fe^{2+}-Ionen keine Reaktivierung der persistierenden Chlamydien zur Folge. Tryptophan supprimiert die EK-Entwicklung in beiden Zelltypen. Dieser Effekt ist in THP-1-Zellen deutlicher ausgeprägt, als in HEp-2-Zellen. Die Blockade der NO-Synthase hat keinen Einfluss auf die *CT*-Infektion in THP-1- und HEp-2-Zellen.
3. Die Rolle Chlamydien-infizierter Monozyten im Entzündungsprozess wurde durch die Untersuchung der Induktion von Entzündungsmediatoren während der Frühphase der persistierenden Infektion analysiert. Sowohl *CT* als auch *CP* induzieren die monozytäre Prostaglandin E_2 (PGE_2)-Synthese, wobei bei gleichen Erregerzahlen pro Wirtszelle *CT* die PGE_2-Synthese stärker induziert als *CP*. Ursächlich für die erhöhte PGE_2-Produktion ist am ehesten eine in der real-time-RT-PCR dokumentierte deutlich erhöhte monozytäre Cyclooxygenase-2-mRNA-Expression. Bei früher persistierender *CT*-Infektion in Monozyten werden insbesondere Th2-Zytokine, hier v.a. IL-10 sezerniert.

Schlagworte: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, Persistenz

Abstract

Chlamydia trachomatis (*CT*) and *Chlamydophila pneumoniae* (*CP*) are obligate intracellular bacteria that can trigger a chronic inflammatory reaction by persistent *i.e.* culture-negative infection of metabolic active pathogens. Epithelial as well as monocytic cells are important host cells for Chlamydia. Monocytic cells play a central role in the dissemination of the pathogen and in chlamydial persistence.
One central problem in investigating chlamydial infections *in vivo* is the frequent mycoplasma-contamination of chlamydial strains.
The here presented investigations should 1. determine the rate of mycoplasma-contamination of *CT*- and *CP*-strains, investigate the effects of these contaminations on chlamydial infections and should further aim for a selective decontamination of Mycoplama, 2. survey possible mechanisms of chlamydial persistence *in vitro* and 3. analyse inflammatory mediators generated in monocytes during persistent chlamydial infection.

1. Nine *CT*- and 17 *CP*-strains were analysed for mycoplasma-contamination applying a broad-spectrum-nested PCR. PCR-specificity was verified applying a newly developed restrictionendonuclease-digestion with *Hpa*I and sequencing of selected PCR-products, respectively 5/9 *CT*- and 6/17 *CP*-strains were found to be contaminated with mycoplasma, i.e. *Mycoplasma fermentans*, *M. hyorhinis* and *M. hominis*. Experiments investigating the biologic relevance of mycoplasma-contaminations in chlamydial cultures show a mycoplasmal dose-dependent suppression of the development of chlamydial elementary bodies (EB) resulting in complete cessation of chlamydial development at high concentrations of Mycoplasma. Mycoplasma-contamination was eliminated by a newly developed method applying the antibiotic Mupirocin on chlamydial cultures. One clinical isolate of *CP* contaminated with *M. hyorhinis* was decontaminated applying this method.
2. The investigations regarding the persistence of *CT* in monocytic THP-1- and epithelial HEp-2-cells show an IFNγ-induced suppression of EB-development. Free iron-II-ions suspend the IFNγ-induced growth reduction in HEp-2-cells completely and partially in THP-cells, respectively. The addition of free iron-II-ions however does not induce reactivation of persistent chlamydial infection in *CT*- infected human peripheral blood monocytes (HPBM). Tryptophane suppresses the EB-development in both cell types. This effect however is more prominent in THP-1-cells compared to the effect in HEp-2-cells. Blockade of the NO-synthetase has no effect on the *CT*- infection in THP-1- and Hep-2-cells.
3. The role of chlamydial-infected monocytes during the inflammatory process was addressed by investigation of induction of inflammatory mediators during the early phase of persistent chlamydial infection. *CT* as well as *CP* induce the monocytic prostaglandin E_2 (PGE_2)-synthesis, however equivalent numbers of *CT* per host cell induce a higher PGE_2-response compared to *CP*. Causative for the higher PGE_2-production is at most an in real-time RT-PCR documented higher expression of monocytic cyclooxygenase-2-mRNA. During early persistent *CT*-infection in monocytes a Th2-specific cytokine pattern is secreted, above all IL-10.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, persistence

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung *I*

Abstract *II*

Abkürzungen *VIII*

1 Einleitung *1*

1.1 Systematik der Chlamydien **1**

1.2 Entwicklungszyklus von Chlamydien **1**

1.3 Durch Chlamydien verursachte Erkrankungen **3**

1.4 Die Persistenz und ihre Bedeutung für die Pathogenese chlamydialer Erkrankungen **6**

1.5 Persistenz und Entzündung **8**

1.6 In vitro Persistenz **9**

1.6.1 Problemstellung mycoplasmenkontaminierte Chlamydien 11

2 Zielsetzung *13*

2.1 Mycoplasmen-Kontamination von Chlamydien-Stämmen **13**

2.2 Analyse der Persistenz in THP-1- und HEp-2-Zellen **13**

2.3 Analyse der Synthese von Entzündungsmediatoren in Monozyten **14**

3 Material *15*

3.1 Geräte **15**

3.2 Verbrauchsmaterial **15**

3.3 Chemikalien **16**

3.4 Lösungen und Medien für die Zell- und Bakterienkultur **17**

3.5 Puffer und Lösungen **18**

3.5.1 Lösungen zur Agarosegelelektrophorese 18

3.5.2 Lösungen und „Kits“ zur DNA-Isolierung 18

3.5.3 Lösungen für Immunfluoreszenz-Färbungen 19

3.5.4 Lösungen für den Immunperoxidase-Assay 19

3.5.5 Lösungen für den PGE_2-ELISA 19
3.5.6 Lösungen für die Elektronenmikroskopie 20

3.6 Enzyme und Proteine 20

3.7 Antikörper 20

3.8 Oligonukleotide 21
3.8.1 Mycoplasmen-16S rDNA-spezifische Primer 21
3.8.2 Humane cox-2-Gen-spezifische Primer 21
3.8.3 Humane RPS9-spezifische Primer 21

3.9 Bakterien 22
3.9.1 *Chlamydia trachomatis*-Stämme 22
3.9.2 *Chlamydophila pneumoniae*-Stämme 22
3.9.3 Mycoplasmen 22

3.10 Zellkulturen 23

4 Methoden 24

4.1 Zellkultur 24
4.1.1 Kultivierung von HEp-2-Zellen 24
4.1.2 Kultivierung und TPA-Differenzierung von THP-1-Zellen 24
4.1.3 Zellzahlbestimmung 24
4.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen 25
4.1.5 Präparation und Kultur von humanen peripheren Blutmonozyten 25

4.2 Chlamydien 26
4.2.1 Anzucht und Präparation von *Chlamydia trachomatis* 26
4.2.2 Aufzucht und Präparation von *Chlamydophila pneumoniae* 27

4.3 Mycoplasmen 27

4.4 Mupirocin-Behandlung 27

4.5 Infektionsversuche 28
4.5.1 Infektion von HEp-2-Zellen mit Chlamydien 28
4.5.2 Infektion von HEp-2-Zellen mit Mycoplasmen 28
4.5.3 Infektion von THP-1-Zellen mit *Chlamydia trachomatis* 29
4.5.4 Infektion von humanen PBMO mit *C. trachomatis* oder *C. pneumoniae* 29
4.5.5 Stimulation humaner PBMO mit LPS 29

4.5.6 IFNγ-Einfluss auf Infektionen von HEp-2-Zellen mit *C. trachomatis* 29
4.5.7 IFNγ-Einfluss auf Infektionen von THP-1-Zellen mit *C. trachomatis* 30
4.5.8 Aminosäure-, Eisen- und NO-Stoffwechsel in *C. trachomatis*-infizierten HEp-2 und THP-1-Zellen 30
4.5.9 Einfluss von Fe^{2+}-Ionen auf die chlamydiale Persistenz in Monozyten 31

4.6 Nachweismethoden für Chlamydien 31
4.6.1 Nachweis infektiöser Chlamydien (Immunoperoxydase-Assay / IPA) 31
4.6.2 Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen 33
4.6.2.1 Fixierung der Zellen für die Immunfluoreszenz 33
4.6.2.2 Direkter Immunfluoreszenzmikroskopischer Test für *CT* 33
4.6.2.3 Direkter Immunfluoreszenzmikroskopischer Test für *CP* 33

4.7 Bestimmung von PGE2 und Zytokinen in HPBM-Kultur-Überständen 34
4.7.1 PGE2-ELISA 34
4.7.2 Cytokin-ELISA´s 34

4.8 Molekularbiologische Methoden 35
4.8.1 Aufreinigung von DNA 35
4.8.2 Aufreinigung von RNA 35
4.8.3 DNaseI-Verdau 36
4.8.4 Reverse Transkription von Gesamt-RNA 36
4.8.5 Real-time PCR 37
4.8.5.1 Ermittlung des optimalen Primer-Verhältnisses 37
4.8.5.2 Durchführung der Real-time-PCR 39
4.8.6 Mycoplasmen-PCR 39
4.8.7 Restriktionsverdau mit der Endonuklease *Hpa*I 41
4.8.8 Agarosegelelektrophorese 41

4.9 Elektronenmikroskopie 41

5 Ergebnisse 43

5.1 Teil I: Mycoplasmen-Kontamination von Chlamydien-Stämmen 43
5.1.1 Mycoplasmen-PCR und Entwicklung einer Methode zur Differenzierung von mycoplasmalen und chlamydialen Amplifikaten 43
5.1.2 Untersuchung von Chlamydien-Isolaten auf Mycoplasmen 45
5.1.2.1 Chlamydia trachomatis-Stämme 45

5.1.2.2 Chlamydophila pneumoniae-Stämme 46
5.1.3 Untersuchung des Einflusses von Mycoplasmen auf die Entwicklung von *Chlamydophila pneumoniae* 47
5.1.4 Entwicklung einer Methode zur Eliminierung von Mycoplasmen aus kontaminierten Chlamydien-Suspensionen 50
5.2 Teil II: Chlamydiale Persistenz in monozytären und epithelialen Zellen 52
5.2.1 Einfluss von IFNγ auf *CT*-Infektionen in THP-1- und HEp-2-Zellen 52
5.2.2 Einfluss von Fe^{2+}-Ionen auf die IFNγ-bedingte Hemmung der EK-Entwicklung in THP-1- und HEp-2-Zellen 57
5.2.3 Einfluss von Eisen auf die chlamydiale Persistenz in Monozyten 61
5.2.4 Einfluss von L-Tryptophan auf IFNγ-behandelte HEp-2- und THP-1-Zellen 62
5.2.5 Einfluss von L-Alanin und L-Phenylalanin auf die EK-Entwicklung in IFNγ-behandelten HEp-2- und THP-1-Zellen 66
5.2.6 Wirkung von 6-Chloro-D,L-Tryptophan auf die EK-Entwicklung in IFNγ-behandelten THP-1- und HEp-2-Zellen 68
5.2.7 Untersuchung der Wirkung von NO-Synthese-Hemmern 70
5.3 Teil III: Induktion von Entzündungsmediatoren durch chlamydiale Infektionen in Monozyten 73
5.3.1 Zeitverlauf der E. coli-LPS- und Chlamydien-induzierten PGE_2-Synthese 73
5.3.2 Individuelle Variabilität der PGE_2-Synthese von HPBM nach Stimulation mit *E. coli*-LPS 75
5.3.3 PGE_2-Synthese von HPBM nach Infektion mit Chlamydien und/oder Mycoplasmen 76
5.3.3.1 Erregerabhängigkeit der PGE_2-Synthese durch HPBM 76
5.3.3.2 Abhängigkeit der erregerinduzierten PGE_2-Synthese durch HPBM von der Inkubationsdauer 77
5.3.3.3 MOI-Abhängigkeit der Chlamydien-induzierten PGE_2-Synthese 78
5.3.3.4 Messung der Expressionsstärke des cox-2-Gens 79
5.3.4 Zytokinproduktion von *CT*-infizierten HPBM 80
6 Diskussion 83
6.1 Teil I: Mycoplasmen-Kontamination von Chlamydien-Stämmen 83
6.1.1 Häufigkeit mycoplasmaler Kontamination von Chlamydien-Stämmen 83
6.1.2 Biologische Effekte von Mycoplasmen auf chlamydiale Infektionen in vitro 84

6.1.3 Eradikation von Mycoplasmen aus Chamydien-Stämmen 86

6.2 Teil II: Mechanismen der chlamydialen Persistenz in THP-1 und HEp-2-Zellen 88

6.2.1 Wirkung von IFNγ und Fe^{2+}-Ionen 90

6.2.2 Bedeutung des Tryptophan-Stoffwechsels 93

6.2.3 NO-Stoffwechsel 99

6.3 Teil III: Synthese von Entzündungsmediatoren in Chlamydien-infizierten humanen peripheren Blutmonozyten 101

6.3.1 Prostaglandin E_2-Sekretion während der Frühphase der persistierenden Infektion 102

6.3.2 Zytokin-Sekretion während der Frühphase der persistierenden Infektion 105

6.4 Eisen-, Tryptophan- und Prostaglandin-Stoffwechsel - Gibt es einen Zusammenhang ? 106

7 Literatur 111

8 Eigene Publikationen 122

8.1 Abstracts 122

8.2 Poster 123

9 Lebenslauf 124

Danksagung 125

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
6-CDLT	6-Chloro-D,L-Tryptophan
CFU	Kolonieformende Einheiten (*colony forming units*)
CIA	Chlamydien-induzierte-Arthritis
CT	*Chlamydia trachomatis*
CP	*Chlamydophila pneumoniae*
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFO	Deferoxamin
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-NMMA	N-Methyl-D-Arginin
DNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxy-Uridin-Triphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
EK	Elementarkörper
Et al.	*et alii*, und andere
Fa.	Firma
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
HEPES	2,4-(2-Hydroxyethyl)-piperazylin-(1)-ethan-sulfonsäure
HPBM	Humane periphere Blutmonozyten
HSP	Hitzeschockprotein
IDO	Indoleamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IFT	Immunfluoreszenztest
IFU	Einschlußkörper bildende Einheit *(inclusion forming units)*

IL	Interleukin
IPA	Immunoperoxydase-Assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
L-NMMA	N-Methyl-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MIC	minimale inhibitorische Konzentration
MOI	Anzahl infektiöser Einheiten pro Zelle *(multiplicity of infection)*
MOMP	Hauptprotein der äußeren Membran *(major outer membrane protein)*
OD	Optische Dichte
HPBM	humane periphere Blutmonozyten
PBS	Phosphat gepufferte Saline *(phosphate buffered saline)*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion *(polymerase chain reaction)*
d p.i.	Tage nach Infektion
reA	reaktive Arthritis
RK	Retikularkörper
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
Ser.	Serovar
TfR	Transferrin-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü. N.	über Nacht

1 Einleitung

1.1 Systematik der Chlamydien

Chlamydien gehören zu den obligat intrazellulären Bakterien. Sie wurden in Vertebraten, Arthropoden, Coelenteraten, Molluscen und Amöben nachgewiesen. Die ursprüngliche Differenzierung verschiedener Chlamydien-Arten erfolgte aufgrund ihrer Morphologie, dem Glykogengehalt der chlamydialen Einschlusskörperchen, der Antigenstruktur der Zellwand und dem Wirtsspektrum (MOULDER, 1988). Inzwischen werden Sequenzunterschiede bestimmter konservierter Gene zur phylogenetischen Einordnung benutzt. Auf der Artenebene befindliche Stämme haben nahezu identische (> 98%) 16S rRNA-Gensequenzen. Für die feinere Aufklärung der phylogenetischen Beziehungen zwischen einzelnen Stämmen werden daher andere, sich im Laufe der Evolution schneller verändernde Gensequenzen, wie die 16S/23S-Spacer-Region genutzt.

Eine phylogenetische Analyse der 16S- und der 23S-rRNA-Gene (EVERETT et al., 1999) ergab eine Neuordnung der Systematik, verbunden mit einer Änderung der Taxonomie der Ordnung *Chlamydiales*. Eine phylogenetische Analyse von Oberflächenproteinen und anderen chlamydialen Proteinen unterstützt die neue Systematik (BUSH & EVERETT, 2001). Neben der Familie der *Chlamydiaceae* wurden nun drei weitere Familien in die Ordnung der *Chlamydiales* aufgenommen (*Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae*). Innerhalb der Familie der *Chlamydiaceae* werden zwei Gattungen, *Chlamydia* und *Chlamydophila* unterschieden. Zur Gattung *Chlamydia* gehören die Spezies *C. trachomatis*, *C. suis* und *C. muridarium*. Die Spezies *C. trachomatis* wird in drei Biovare unterteilt, das Biovar Trachoma mit den Serotypen A, B und C, Lymphogranuloma venerum (LGV) mit den Serotypen L1, L2 und L3 und Mauspneumonitis. Die Gattung *Chlamydophila* beinhaltet 6 Spezies (*C. pneumoniae, C. pecorum, C. caviae, C. felis, C. psittaci* und *C. abortus).*

1.2 Entwicklungszyklus von Chlamydien

Die obligat intrazellulären Chlamydien sind in ihrer Vermehrung auf intakte Wirtszellen angewiesen, in denen sie einen einzigartigen Entwicklungszyklus durchlaufen. Dabei kommt es zu einem Wechsel von zwei Organisationsformen, den Elementarkörperchen mit einem Durchmesser von 200 – 300 nm und den Retikularkörperchen mit einem Durchmesser von bis zu 1000 nm. Die

Elementarkörper sind die infektiöse Form der Chlamydien. Sie sind metabolisch inaktiv und können extrazellulär überleben bis sie von permissiven Wirtszellen durch rezeptorvermittelte Endozytose (WARD & MURRAY, 1984; HODINKA et al., 1988; WYRICK et al., 1989 und 1993; MOULDER, 1991) aufgenommen werden. Nach der Aufnahme in die Wirtszelle kommt es zu einer Umwandlung der Elementarkörper zum metabolisch aktiven Retikularkörper (HATCH, 1996). Diese Form vermehrt sich innerhalb intrazellulärer Vakuolen, den Einschlusskörpern durch Querteilung (TODD et al., 1976). Nach mehreren Teilungen kommt es zur Reorganisation der Retikularkörper zu Elementarkörpern. Diese werden durch Zelllyse oder Exozytose aus der Wirtszelle freigesetzt und sind in der Lage weitere Zellen zu infizieren (LEVITT & BAROL, 1987).

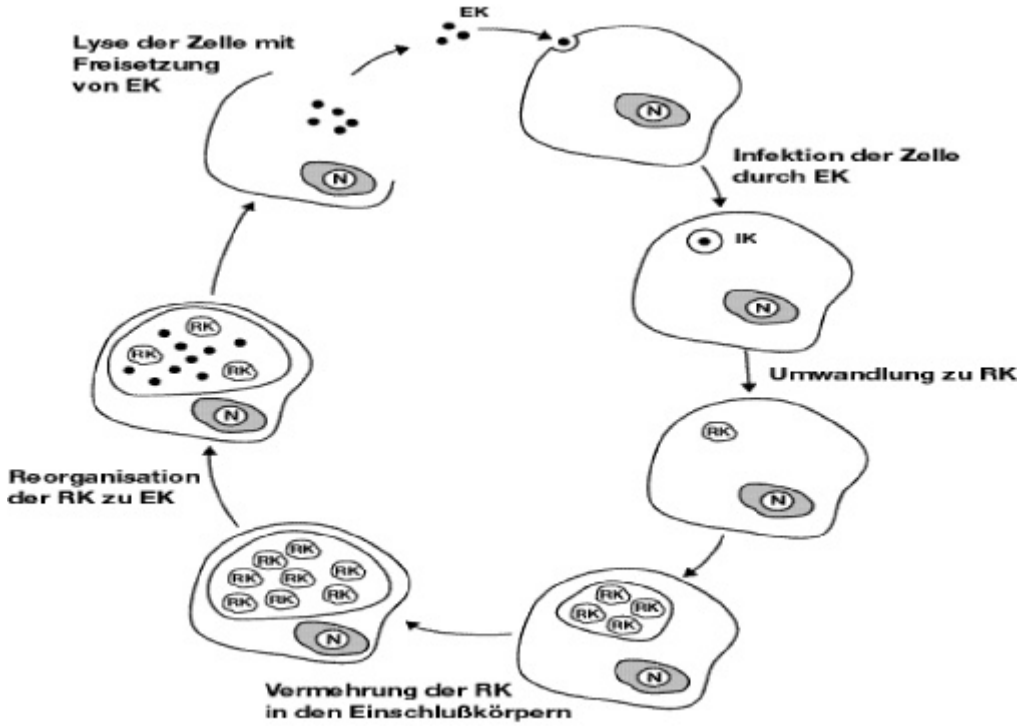

Abb. 1: Entwicklungszyklus von *Chlamydia trachomatis*
(EK = Elementarkörper; RK = Retikularkörper; IK = Intermediärkörper) nach LEVIT et al.,1987

Dieser Ablauf der chlamydialen Entwicklung wird als „produktive Infektion“ bezeichnet, weil sie in der Vermehrung infektiöser Chlamydien resultiert.

Die Länge des Entwicklungszyklusses ist je nach Spezies verschieden. Bei *Chlamydia trachomatis* dauert er 36 – 42 Stunden, bei *Chlamydophila pneumoniae* 72 – 96 Stunden. Dabei sind die einzelnen Entwicklungsphasen zeitlich nicht voneinander zu trennen, da sie nicht synchron verlaufen. Viele RK teilen sich noch, nachdem die Reorganisation zu EK bereits begonnen hat. Für *C. trachomatis* wurde

beobachtet, dass die Wirtszellen nach dem Einstellen der chlamydialen Vermehrung mehrere Stunden lang intakt bleiben, bevor die Freisetzung der Chlamydien erfolgte.

1.3 Durch Chlamydien verursachte Erkrankungen

Durch Chlamydien hervorgerufene Infektionen zählen zu den häufigsten bakteriellen Infektionen weltweit. Das Spektrum der Erkrankungen zeigt eine große Variationsbreite mit z. T. schweren klinischen Manifestationen. *C. pecorum* und *C. psittaci* umfassen verschiedene tierpathogene Erreger (STORZ, 1988, FUKUSHI & HIRAI, 1992). *C. psittaci* ist zudem als Auslöser der Ornithose beim Menschen bekannt. Der früher als TWAR bezeichnete Stamm, der ursprünglich für einen untypischen *C. psittaci*-Stamm gehalten wurde, ist später als neue Spezies *C. pneumoniae* identifiziert worden (GRAYSTON et al., 1993). Sie bildet die Hauptursache akuter Infektionen des Respirationstraktes im Menschen. Viele Studien ergaben, dass ***C. pneumoniae*** für 5 – 20% aller Fälle einer erworbenen Pneumonie verantwortlich sind. Ein Zusammenhang wurde auch zwischen Infektionen mit *C. pneumoniae* und anderen akuten und chronischen Erkrankungen beobachtet.

Tabelle 1: Akute Infektionen durch *C. pneumoniae*

Erkrankung	**Quelle**
Akute Infektionen:	
Sinusitis und Otitis media	OGAWA et al., 1992 BLOCK et al., 1997
Pharyngitis	THOM et al., 1990
Endokarditis	NORTON et al., 1995
Myokarditis	WESSLEN et al., 1992
Erythema nodosum	SUNDELOF et al., 1993
Akutes Nierenversagen	MARCHANT et al., 1995
Meningitis	SUNDELOF et al., 1993
Enzephalitis	FRYDEN et al., 1989
Meningoenzephalitis	SOCAN et al., 1994
Dysfunktion des Cerebellums	KORMAN et al., 1997
Guillain-Barré-Syndrom	HAIDL et al., 1992
Lumbosakrale Meningoradikulitis	MICHEL et al., 1992

Tabelle 2: **Chronische Infektionen durch *C. pneumoniae***

Erkrankung	Quelle
Chronische Erkrankungen:	
Reaktive Luftwegserkrankungen bei Kindern	EMRE et al., 1994
Im Erwachsenenalter einsetzendes Asthma und exazerbiertes Asthma bei Erwachsenen	HAHN et al., 1991
Sarkoisose	POULAKKAINEN et al., 1996
Reaktive Arthritis	BRAUN et al., 1994
Multiple Sklerose	SRIRAM et al., 1998
Morbus Alzheimer	BALIN et al., 1998
Koronare Herzerkrankungen	MEHTA et al., 1998

Viele Hinweise aus experimentellen und klinischen Studien, basiert auf Entzündungsmarkern und -mediatoren in Blutplasma und Proben aus arteriosklerotischem Gewebe belegen einen Zusammenhang zwischen Arteriosklerose und chronischen Entzündungsprozessen. Dies führte zur Zuordnung koronarer Herzerkrankungen zu entzündlichen Erkrankungen (ROSS, 1993; MEHTA et al., 1998). Weitere Daten implizieren, dass *CP* in die Auslösung und Aufrechterhaltung dieser Entzündungsprozesse beteiligt ist (MEHTA et al., 1998).

C. trachomatis umfasst bis auf den Maus Pneumonitis Biovar ausschließlich humanpathogene Erreger. Eine Klassifizierung der Biovare Lymphogranuloma venerum (LGV) und Trachoma in insgesamt 18 Serotypen findet aufgrund eines Mikroimmunfluoreszenztestes statt, der auf spezifischen Immunologischen Reaktionen beruht.

Der LGV-Biovar mit seinen Serotypen L1 bis L3 verursacht die sexuell übertragbare Krankheit Lymphogranuloma venerum.

Der Biovar Trachoma wird in die Serotypen A-K, Ba, Da und Ia unterteilt (WANG & GRAYSTON, 1990). Man unterscheidet hier die okulären Biovare A – C, die die Konjunktiva infizieren und die Stämme D – K, die Infektionen des Urogenitaltraktes hervorrufen. Das Trachoma Biovar zeichnet sich durch eine eingeschränkte Wirtszellspezifität aus. Die Zielzellen sind epitheliale Zellen der Konjunktiva und der Mukosa im Urogenitaltrakt (KUO, 1988).

Die Serovare A – C des Trachoma Biovars führen zur Entstehung des Trachoms und stellen die weltweit häufigste Ursache der infektiösen Erblindung dar. In der sog. Dritten Welt sind 150 Mio Menschen infiziert, von denen ca. 6 Mio erblindet sind (THYLEFORS et al., 1995). Eine wiederholte Reinfektion oder Persistenz der Bakterien wird für eine Chronifizierung der Entzündung verantwortlich gemacht, die zu einer Vernarbung und letztendlich zur Erblindung führen kann (TAYLOR et al., 1982; GRAYSTON et al., 1985; WARD et al., 1990).
Infektionen mit den Serovaren D – K sind verursachen die weltweit häufigsten sexuell übertragbaren Erkrankungen (WHO, 1996). Sie manifestieren sich in einer ganzen Bandbreite klinischer Syndrome. Bei Männern bildet *C. trachomatis* die häufigste Ursache der nicht gonorrhoeischen Urethritis, die sich durch Aszendenz zu einer Prostatitis oder Epididymitis entwickeln kann. *C. trachomatis* wird zudem als Auslöser für die Sterilität beim Mann diskutiert (GREENDALE et al., 1993; PURVIS & CHRISTIANSEN, 1993). Bei Frauen manifestiert sich eine *CT*-Infektion gewöhnlich als Cervicitis. Davon ausgehend kommt es häufig zur Aszendenz der Erreger in den oberen Genitaltrakt. Als Folge dessen kann sich eine Salpingitis, auch als PID (*pelvic inflammatory disease*) bezeichnet, entwickeln. Andere folgenschwere Manifestationen neben der PID sind eine tubenbedingte Infertilität oder eine ektopische Schwangerschaft (CATES & WASSERHEIT, 1991).
Eine weitere Komplikation chlamydialer Urogenitalinfektionen ist die Entwicklung einer reaktiven Arthritis in 1 – 3% der Krankheitsfälle (KEAT et al., 1979; WOLLENHAUPT & ZEIDLER, 1990). Unter einer reaktiven Arthritis wird eine sterile Gelenkentzündung verstanden, die im Anschluß an eine extraartikuläre Infektion auftritt. Es handelt sich klinisch vorwiegend um eine asymmetrische Oligoarthritis der unteren Extremitäten. Obwohl es bei einem Teil der Patienten zur spontanen Remission kommt, liegt der Anteil eines chronischen Krankheitsverlaufes der Chlamydien-induzierten-Arthritis (CIA) bei ca. 40 – 70% (FOX et al., 1979; FIRESTINE & ZVAIFLER, 1987, ZEIDLER, 1991).

Insgesamt ist zu beobachten, dass Chlamydien eine Tendenz zu chronischen Infektionsverläufen zeigen. Diese können mit schweren Manifestationen, wie Erblindung, Infertilität, ektoper Schwangerschaft und einem chronischen Verlauf einer reaktiven Arthritis einhergehen.

1.4 Die Persistenz und ihre Bedeutung für die Pathogenese chlamydialer Erkrankungen

Verschiedene Indizien deuten auf einen Zusammenhang von persistenten chlamydialen Infektionen mit chronischen Erkrankungen (Übersicht in BEATTY et al., 1994b). Ist ein Erreger für die Entwicklung einer Krankheit verantwortlich, so wird zur Klärung dieses Kausal-Zusammenhanges die Erfüllung der Koch´schen Postulate vorausgesetzt. Diese beinhalten die regelmäßige Isolierung der Keime bei Krankheitsfällen (1), eine Züchtung von Reinkulturen *in vitro* (2), eine experimentelle Auslösung des entsprechenden Krankheitsbildes in empfänglichen Versuchstieren (3) und eine Reisolierung der Keime aus Versuchstieren (4). Persistente Chlamydien befinden sich jedoch in einem nicht infektiösen und damit nicht anzüchtbaren Zustand. Die Koch´schen Postulate der Anzüchtbarkeit und Kultivierbarkeit können also nicht erfüllt werden.

Für chronisch entzündliche Arthritiden wurde von TAYLOR-ROBINSON & KEAT (2001) eine Reihe von Vorschlägen zur Erhellung des Kausalzusammenhangs zwischen Krankheit und Infektionserreger vorgestellt:

Dazu gehören eindeutige Kriterien wie Detektion durch Molekularbiologische Methoden, Isolierung durch Kultur, Ansprechen auf antibiotische Therapie und Besserung der Krankheit durch Verabreichung einer erregerspezifischen Vaccine. Weitere Kriterien sind die wiederholte Detektion in mehreren Proben eines Patieten, die Detektion in frühen Krankheitsstadien, ein Konsens zwischen verschiedenen Autoren, und spezifische Antikörper-Antworten oder zelluläre Immunantworten. Diese Kriterien müssen gegen Kontrollgruppen ohne Krankheitssymptome ausgewertet werden und sind daher schwieriger zu beurteilen.

Für chronische chlamydiale Infektionen sind auch die meisten dieser Kriterien nur selten erfüllt oder nicht eindeutig zu beurteilen.

Nur in seltenen Fällen gelang der kulturelle Nachweis von Chlamydien in chronischen Fällen des Trachoms (SCHACHTER et al., 1988; WARD et al., 1990). Für eine Persistenz von *CT* in einem kulturnegativen Status sprechen auch Daten aus einem Primatenmodell mit okulären Infektionen und Trachoma-Patienten. Ein Nachweis von chlamydialer rRNA ist noch lange möglich, nachdem eine Antigendetektion negativ war (HOLLAND et al., 1992; HUDSON et al., 1992;

CHEEMA et al., 1991). Die Autoren deuten den Nachweis chlamydialer RNA als einen Hinweis auf das Vorliegen vitaler Bakterien.

Auch bei Erkrankungen des Genitaltraktes wurden Charakteristika einer Persistenz beschrieben. Viele Infektionen verlaufen hier symptomlos und können sich zu einer asymptomatischen PID entwickeln (SELLORS et al., 1988; THEIJLS et al., 1991; CATES & WASSERHEIT, 1991). In diesen Fällen ist eine kulturelle Anzucht der Bakterien nur selten möglich (KANE et al., 1984; BRUNHAM et al., 1985; THEIJLS et al., 1991). Allerdings fanden sich chlamydiale Antigene und/oder Nukleinsäuren im Endometrium oder in den Tuben kulturnegativer, infertiler Frauen (CAMPBELL et al., 1993; KIVIAT et al., 1986; SOONG et al., 1990; THEIJLS et al., 1991, PATTON et al., 1994, SHEPARD & JONES, 1989). GERARD et al. konnten zeigen, dass in den Tuben von Frauen mit ektoper Schwangerschaft vitale, metabolisch aktive Chlamydien vorliegen (GERARD et al., 1998b).

Bei der CIA besteht eine vergleichbare Situation. Es ist ein Charakteristikum dieser Erkrankung, dass eine kulturelle Anzucht der Erreger aus den Gelenken betroffener Patienten nicht gelingt. Die initiale Beobachtung des intraartikulären Erregernachweises von *Chlamydia trachomatis* durch Immunfluoreszenz von Keat und Mitarbeitern konnte von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (KEAT et al., 1987). Elektronenmikroskopisch ließen sich im Synovialgewebe intrazellulär Einschlußkörper darstellen, die chlamydialen Retikularkörpern ähnlich waren, aber Zeichen atypischen Wachstums aufwiesen (ISCHIKAWA et al., 1986; SCHUMACHER et al., 1988). Diese morphologisch atypischen Chlamydien werden im Gelenk hauptsächlich in Makrophagen und vereinzelt in Synovialfibroblasten gefunden (BEUTLER et al., 1995). Der Nachweis dieser aberranten Formen ist auf eine Zone unterhalb der Synovialmembran beschränkt, die von Entzündungszellen infiltriert ist (NANAGARA et al., 1995). Ähnliche atypische Erreger wurden bereits bei anderen persistierenden Chlamydieninfektionen nachgewiesen. Sie gelten als morphologische Korrelate persistierender Chlamydieninfektionen (WARD, 1995). Durch den Einsatz der PCR- und der *in situ*-Hybridisierung konnte darüber hinaus chlamydiale rRNA und DNA im Gelenk identifiziert werden (BAS et al., 1995; BEUTLER et al., 1994; HAMMER er al., 1992; RAHMAN et al., 1992; TAYLOR-ROBINSON et al., 1992). Chlamydiale Moleküle wurden selbst im Synovialgewebe von Patienten mit reaktiver Arthritis entdeckt, die seit mehr als 10 Jahren erkrankt waren. Die *Chlamydia trachomatis*-Infektion im Gelenk kann sich somit über mehrere

Jahre erstrecken (NANAGARA et al., 1995). Mittels RT-PCR wurde gezeigt, daß diese aberranten chlamydialen Organisationsformen vital und metabolisch aktiv sind. Es ließen sich kurzlebige chlamydiale rRNA Transkripte und mRNA im Gelenk nachweisen. Da beide RNA-Arten eine kurze Halbwertszeit aufweisen, ist ihre Detektion an das Vorhandensein lebendiger, stoffwechselaktiver Chlamydien gebunden (GÉRARD et al., 1998a).

1.5 Persistenz und Entzündung

Bei chronischen Entzündungen bilden vor allem Makrophagen und Lymphozyten das zelluläre Infiltrat. Während einer Entzündungsreaktion setzen diese Zellen eine Vielzahl von Mediatoren frei, die einerseits einen Großteil der Abwehrleistung vollbringen und andererseits für die Symptome der Entzündung verantwortlich sind. So werden von aktivierten Makrophagen Enzyme, Prostaglandine und Cytokine gebildet, die das Entzündungsgeschehen unterhalten.
Chlamydien-infizierte Monozyten/Makrophagen, die vitale stoffwechselaktve Erreger enthalten, sind bei der Chlamydien-induzierten Arthritis pathogenetisch relevant. Sie sind für die Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung verantwortlich. Die Expression von chlamydialem heat shock protein und das Vorhandensein chlamydienspezifischer Antikörper und T-Zellen in der Synovialflüssigkeit entzündeter Gelenke sind Indizien für die immuologische Relevanz der Chlamydien im Entzündungsgeschehen des Gelenkes (BULUT et al., 2002; CAMPBELL et al., 1996; GASTON et al., 1996; GOODALL et al., 2001; MATYSZAK & GASTON, 2002, THIEL et al., 2000).

Direkt Makrophagen-aktivierend wirken chlamydiales heat shock protein (HSP) und Lipopolysaccharid (LPS). Sie induzieren die Synthese der Monokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) (ROTHERMEL et al., 1989; INGALLS et al., 1995). Reicht die direkte Aktivierung der Makrophagen nicht aus, um die Erreger zu eliminieren, so setzen Immunreaktionen ein, die eine heftigere Antwort auf die Infektion bewirken. Dazu gehört die Stimulation von T-Lymphozyten, die ihrerseits eine verstärkte Aktivierung der Makrophagen bewirkt. Chlamydiales HSP kann T-Zellen zur Synthese von Interferon-γ (IFNγ) und Interleukin-2 (IL-2) stimulieren (WARD, 1995). Diese Lymphokine stimulieren weiterhin die Monokin-Synthese in Makrophagen (NARUMI et al., 1990).

Eine bedeutsame Rolle in Entzündungsprozessen spielen auch die Prostaglandine. Prostaglandin E_2 ist z. B. ein wichtiger proinflammatorischer Mediator, der bei Entzündungen Schwellung, Rötung und Schmerz vermittelt.
Schlüsselenzyme der Prostaglandinsynthese sind die Cyclooxygenasen. Sie konvertieren die aus der zellulären Membran freigesetzte vierfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure in Prostaglandin H_2. Spezifische Prostaglandinisoenzyme verwandeln Prostaglandin H_2 in die verschiedenen Prostanoide wie z.B. Prostaglandin E_2, Prostacyclin und Thromboxan.
1991 konnte gezeigt werden, dass von der Cyclooxygenase nicht nur ein Enzym, sondern zwei Isoformen existieren, die Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 (MASFERRER et al., 1990; KUJUBU et al., 1991 und XIE et al., 1991). Die Cyclooxygenase-1 (COX-1) wird konstitutiv in verschiedenen Organsystemen exprimiert und ist für die Aufrechterhaltung der entsprechenden Organfunktion durch die Synthese von Prostaglandinen verantwortlich. Die Bildung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) wird dagegen überwiegend durch Mediatoren der Entzündung wie z.B. Zytokine und bakterielles Lipopolysaccharid induziert.
Ob auch Chlamydien-Infektionen in Monozyten eine Prostaglandin-Synthese induzieren können war bisher noch nicht Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

1.6 In vitro Persistenz

Aufgrund der Relevanz persistenter Infektionen *in vivo* wurden eine Reihe von Modellen entwickelt, um Mechanismen und Bedeutung der Persistenz zu untersuchen.
LEE (1981) und LEE & MOULDER, 1981 beschrieben erstmals eine persistente Infektion in einem Zellkultursystem. Eine *CT*-Infektion in Mausfibroblasten wechselte zwischen Phasen intensiver Wirtszellzerstörung mit produktiver Chlamydieninfektion und Phasen einer Wirtszellproliferation über einen Zeitraum von mehreren Monaten.
Die meisten Untersuchungen zur Persistenz bezogen sich auf Persistenz-induzierende Faktoren. Persistenz-induzierend wirken die Erniedrigung der Konzentrationen essentieller Metabolite, die Anwesenheit von Wirtsfaktoren wie IFNγ oder Antibiotika (HOLMES, 1998). Derartige Bedingungen behindern im Allgemeinen die RK-Reifung oder inhibieren deren Differenzierung zum infektiösen EK und sind mit morphologischen Veränderungen verbunden.

Die Depletion von Aminosäuren während der Kultur von infizierten Fibroblasten führt zur Entwicklung einer persistenten Infektion, die durch einen drastischen Rückgang der Chlamydien und die Ausbildung vergrößerter anormaler Chlamydien-Partikel charakterisiert ist (HATCH, 1975; ALLAN et al., 1985; COLES et al., 1993). Nach Wiederherstellung der ursprünglichen Medien-Zusammensetzung kommt es zur Reaktivierung einer produktiven Infektion.

Ein weiteres Modell stellt die IFN-γ-induzierte Persistenz dar. Am intensivsten wurden epitheliale Cervix-Zellen, infiziert mit *C. trachomatis* Serovar A untersucht (BEATTY et al., 1993). Die IFN-γ-Behandlung führt zur Entwicklung atypischer Einschlüsse mit abberant vergrößerten Chlamydien, die nicht infektiös sind. Nach BEATTY et al., 1994a beruht dies auf der Induktion des tryptophandegradierenden Enzyms Indoleamindioxygenase (IDO). Durch Zugabe von exogenem Tryptophan kann die Wachstumshemmung aufgehoben werden. Eine andere Studie demonstrierte die Effekte von Interferon-γ auf *C. pneumoniae*-infizierte HEp-2-Zellen (PANTOJA, 2001). In Abhängigkeit von der eingesetzten IFN-γ-Dosis kam es zu einem Abfall der *CP*-Replikation mit der Ausbildung morphologisch abberanter Chlamydien-Partikel. Wurde das IFN-γ entfernt, reorganisierten sich die abberanten Chlamydien wieder zu infektiösen EK.

Auch durch Zugabe von Antibiotika, z. B. Penicillin wird die Differenzierung von RK zu EK behindert und es entwickeln sich morphologisch abberante Formen, die sich nach Entzug des Antibiotikums wieder zu infektiösen EB reorganisieren können MATSUMOTO & MANIRE, 1970; KRAMER & GORDON, 1971; JOHNSON & HOBSON, 1977; CLARK et al., 1982).

Untersuchungen zur Persistenz wurden im Allgemeinen in epithelialen Zellen durchgeführt. Bei chronischen chlamydialen Erkrankungen sind aber Monozyten und Makrophagen Zielzellen der Erregerpersistenz.

Der Untersuchung der chlamydialen Persistenz in Monozyten sind Grenzen gesetzt, die die Aufklärung der vorhandenen Mechanismen erschweren. So entsprechen die HPBM-Präparationen über Ficoll-Separation und Plastikadhärenz Gemischen aus Monozyten, Lymphozyten, Thrombozyten und kleinen Anteilen an weiteren Blutzellen. Weiterhin sind die biologische Variabilität der Blutspender und die begrenzte Zahl der bei einer Blutentnahme präparierbaren HPBM für die

Reproduzierbarkeit der zum Teil umfangreichen Versuchsansätze begrenzende Faktoren.

Zur Untersuchung der monozytären Mechanismen der Persistenz wurde daher als Modellsystem einer monozytären Zelle die humane promonozytäre Vorläuferzelllinie THP-1 verwendet. Sie exprimiert den Monozyten/Makrophagen-Oberflächenmarker CD14, ist mit dem Phorbolester TPA zu einem makrophagen-ähnlichen Stadium differenzierbar und kann die IDO exprimieren. Die Infizierbarkeit dieser Zellen durch *Chlamydia trachomatis* ist in der Dissertation von C. BONK, 1997 beschrieben worden.

1.6.1 Problemstellung mycoplasmenkontaminierte Chlamydien

Eine besondere Schwierigkeit bei der Analyse von Chlamydieninfektionen *in vitro* stellt die häufige Kontamination von Chlamydien-Stämmen mit verschiedenen Mycoplasmen-Spezies dar. Bei *in vitro* Versuchen mit Chlamydien ist diese Problematik wiederholt beschrieben worden (MESSMER et al., 1994; HUNICHE et al., 1998). Sowohl die benutzten Zellkulturen als auch die kommerziell erhältlichen Chlamydienstämme können potentielle Ursachen der Kontaminationen sein. Die Angaben zur Häufigkeit von Mycoplasmen-Kontaminationen in Zellkulturen schwanken je nach Autor und Nachweismethode zwischen 5 und 87% (HAY et al., 1989; BÖLSKE, 1988; DUFFURGET et al., 1994; VERKOOYEN et al., 1997). Besonders häufige Erreger sind in diesem Zusammenhang *Mycoplasma fermentans, M. hyorhinis, M. .orale* und *M. arginini*, die zusammen bis zu 85% aller mycoplasmalen Kontaminanten ausmachen (UPHOFF & DREXLER, 2002; BARILE et al., 1973; BÖLSKE, 1988;). Weiterhin sind noch Acholeplasma laidlawii und M. hominis zu nennen. *M. hominis* wurde nur in < 1% bis 6% der Fälle als Zellkultur-Kontaminante erkannt (BARILE ET AL., 1973; BÖLSKE, 1988; UPHOFF & DREXLER, 2002)

In Chlamydien-Sämmen wurden zum Teil auch mehrere Mycoplasmen-Arten nachgewiesen. HUNICHE et al. (1998) beschrieben die Kontamination von 3/6 *C. pneumoniae*-Stämmen der ATCC mit *M. hominis* oder *M. orale* oder einer Kombination aus diesen beiden Arten. Zwei finnische Isolate waren ebenfalls mit *M. hominis* und *M. orale* infiziert. *M. hominis* und *M. hyorhinis,* sowie eine nicht bestimmbare Spezies wurden in 3/10 untersuchten *CP*-Stämmen aus klinischen Isolaten von MESSMER et al. (1994) detektiert. In *CP*-Stämmen wurde *M. hominis* häufiger nachgewiesen, als in Zellkulturen erwartet (HUNICHE et al., 1998).

Ob das biologische Verhalten von *C. trachomatis*- oder *C. pneumoniae*-Infektionen durch Mycoplasmen beeinflusst werden kann, war bisher noch nicht untersucht.

2 Zielsetzung

2.1 Mycoplasmen-Kontamination von Chlamydien-Stämmen

In der Literatur wurden Mycoplasmen-Kontaminationen von Chlamydien-Stämmen häufig beschrieben. Allerdings war die Zahl der untersuchten Chlamydien-Stämme gering. Im Rahmen dieser Arbeit sollte aus einer Sammlung von 26 Chlamydien-Stämmen (9 *Chlamydia trachomatis (CT*)- und 17 *Chlamydophila pneumoniae (CP)*-Isolate) aus verschiedenen Quellen der Anteil Mycoplasmen-kontaminierter Chlamydienstämme bestimmt werden.

Zur Detektion von Mycoplasmen in Chlamydien-Stämmen wurde eine Multiplex-nested-PCR gewählt, die 15 verschiedene zellkulturrelevante und humanpathogene Mycoplasmen-Arten detektieren kann (WIRTH et al., 1994). Die positiven Befunde sollten mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung der PCR-Produkte mit Bestimmung der Mycoplasmen-Spezies verifiziert werden.

Die biologische Relevanz mycoplasmaler Kontaminationen für *CT* bzw. *CP*-Infektionen war bisher nicht belegt. Daher sollte der Einfluss von *Mycoplasma fermentans* und *M. hyorhinis*-Infektionen auf *CP*-Infektionen in HEp-2-Zellen *in vitro* untersucht werden.

Weiterhin wurde eine Eradikation von Mycoplasmen aus einer kontaminierten *C. pneumoniae*-Präparation angestrebt. Es sollte eine Methode erarbeitet werden, die selektiv Mycoplasmen eliminiert, ohne die Vitalität der Wirtszellen oder Chlamydien zu beeinträchtigen.

2.2 Analyse der Persistenz in THP-1- und HEp-2-Zellen

Diejenigen Faktoren, die die persistierende chlamydiale Infektion in monozytären Zellen beeinflussen, sind bis heute unbekannt. Es werden einige Faktoren diskutiert (IFNγ, Fe^{2+}-Ionen, Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase-Inhibitoren, Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO)-Hemmer und Tryptophan), die jedoch nur in epithelialen Zellen oder für andere intrazelluläre Erreger beschrieben sind. In dieser Arbeit sollten THP-1-Zellen mit dem Phorbolester TPA zu adhärenten, makrophagenähnlichen Zellen differenziert und als Modellsystem für die chlamydiale Persistenz in Monozyten verwendet werden. IFNγ, Fe^{2+}-Ionen, NO-Synthase-Inhibitoren, IDO-Hemmer und Tryptophan sollten in diesem System auf ihre Wirkung bei Chlamydien-Infektionen getestet werden. Dazu sollte der Infektionsverlauf von *CT* in THP-1-Zellen durch Färbung der gebildeten EK mittels Immunoperoxydase-Assay und Auswertung von

Anzahl und Größe der Einschlusskörper untersucht werden. Zum Vergleich sollten humane epitheliale Zellen (HEp-2-Zellen) ebenfalls mit allen genannten Substanzen getestet und die Ergebnisse zu den in THP-1-Zellen erhobenen Befunden in Beziehung gestellt werden.

2.3 Analyse der Synthese von Entzündungsmediatoren in Monozyten

Chlamydien können als persistierende Erreger chronische Entzündungen auslösen. Welche Entzündungsmediatoren während einer persistierenden chlamydialen Infektion in humanen peripheren Blutmonozyten synthetisiert werden, wurde bisher noch nicht untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von *CT*- und *CP*-Infektionen auf die monozytäre Prostaglandin- und Zytokinproduktion zu untersuchen.

Periphere humane Blutmonozyten aus buffy coats sollten über Ficoll-Gradienten und Plastikadhärenz gewonnen und mit Chlamydien infiziert werden. Das während der Frühphase der persistierenden Infektion in Monozyten gebildete Prostaglandin E_2, sowie die Zytokine IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p75 und TNFα sollten mittels ELISAs im Überstand der Zellkultur gemessen werden.

3 Material

3.1 Geräte

ABI Prism® 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Absaugeinrichtung (Vacusafe)	Integra Biosciences, Fernwald
Bildanalyse-Software (analySIS®)	Soft Imaging System, Münster
Begasungs-Brutschränke	Hereaus, Osterode
Cytoclips™	Shandon, Frankfurt
Cytospin 3	Shandon, Frankfurt
Einfrier-Container	Nalgene, Rochester, NY, U.S.A.
Elektrophoresekammern Horizon®	Life Technologies, Karlsruhe
ELISA-Reader TECAN	SLT Instruments, Crailsheim
Feinwaage H 54	Mettler, Giessen
GeneRunner Version 3.05	Hastings Software Inc.
Laborwaage	Sartorius, Göttingen
Mikroskope	
Olympus CK 40	Olympus, Hamburg
Leica Biomed	Leitz, Wetzlar
Mikrowelle	Bauknecht, Neunkirchen
PCR-Thermocycler	
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Gene Amp PCR-System	Perkin Elmer, Norwalk, UK
pH-Meter (pH 525)	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe (Pipettboy plus)	Integra Biosciences, Fernwald
Polaroid-Kamera MP 4+	Polaroid, Cambridge, MA, U.S.A.
Mikrotiterplattenschütler (Titramax 1000)	Heidolph, Kehlheim
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Spannungsgeräte	BioRad, München
Sterilbanken Herasafe	Hereaus, Osterode
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Omnilab/Jürgens, Hannover
UV-Tisch	Peqlab, Erlangen
Vortex Genie 2	Bender und Hobein, Ismaning
Wasserbad	GFL, Hannover
Zählkammer nach Neubauer (Assistent)	Karl Hecht KG, Sontheim
Zentrifugen	
Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Labofuge 400e	Hereaus, Osterode
Rotanta 46 RSC	Hettich, Tuttlingen
Suprafuge 22	Hereaus, Osterode

3.2 Verbrauchsmaterial

Filme Polapan	Polaroid, Cambridge, MA, U.S.A
Filter-cards	Shandon, Frankfurt
Glasperlen (∅ 2-3 mm)	Roth, Karlsruhe
Kammerdeckelobjektträger	
Lab-Tek™ II-Chamber-Slide™	Nunc, Wiesbaden

Kulturflaschen	
25 cm^2 -Polystyrol	Greiner, Frickenhausen
75 cm^2 -Polystyrol	Greiner, Frickenhausen
182 cm^2 -Polystyrol	Greiner, Frickenhausen
Kulturschalen	
6 well Multischalen (Nunclon™)	Nunc, Wiesbaden
24 well Multischalen (Nunclon™)	Nunc, Wiesbaden
96 well Multischalen (Nunclon™)	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten, Flachboden MicroWell™	Nunc, Wiesbaden
Multipetteneinsätze (Combitips plus)	
(1, 2,5, 5, 10ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen mit Filter	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	
0,1 ml Reaktionsgefäße für PCR	Biozym, Hess. Oldendorf
1,5 ml Safe seal Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
2,0 ml Safe seal Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
1,8 ml Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
5 ml Polystyrolröhrchen	Greiner, Frickenhausen
15 ml und 50 ml Falcons-PP-tubes	Greiner, Frickenhausen
Leucosep-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Real-time-PCR-Zubehör	
MicroAmp®96 well	
optical reaction plate	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABI Prism® Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems, Weiterstadt
Spritzen-Sterilfilter	
Millex®-VV PVDF, 0,1 µm	Millipore, Bedford, MA, U.S.A.
Rotilabo® PVDF, 0,22 µm	Roth, Karlsruhe

3.3 Chemikalien

Agarose ultra pure	Life Technologies, Paisley, UK
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
6-Chloro-D,L-Tryptophan	von C.R. MacKenzie, Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, erhalten
4-Chloro-1-naphthol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Corbit-Balsam	Hecht, Kiel-Hassee
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Deferoxamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA-Marker V	Boehringer, Mannheim
dNTP	Amersham Pharm., Heidelberg
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Evans Blue	Sigma, Deisenhofen
L-Alanin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin (200 mmol)	Biochrom KG, Berlin

Methanol abs.	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
Mountingfluid	Trinity Biotech/Dade Behring, Marburg
N-Methyl-D-Arginin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
N-Methyl-L-Arginin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TRIzol Reagent	Invitrogen/Life technologies, Karlsruhe
Trypanblau 0,5%	Biochrom KG, Berlin

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen

3.4 Lösungen und Medien für die Zell- und Bakterienkultur

HANK´s Lösung (steril), (MHH-Apotheke, Hannover)	8,0 g NaCl 0,4 g KCl 0,121 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O 0,06 g KH_2PO_4 0,1 g $MgSO_4$ x 7 H_2O 0,185 g $CaCl_2$ x 2 H_2O 1,0 g Glucose x H_2O 0,1 g $MgCl_2$ x 6 H_2O 0,35 g $NaHCO_3$ 0,01 g Phenolrot Aqua dest. ad. 1l
DC-Medium	CellGenix, Freiburg
Einfriermedium	50% RPMI (Gibco BRL) 30% FKS (hitzeinaktiviert) 20 % DMSO
Infektionsmedium	Kulturmedium + 1 µg/ml Cycloheximid
Kulturmedium	RPMI 1640 (Gibco-BRL) 5% FKS (hitzeinaktiviert) 2mM L-Glutamin
Lymphozyten-Separationsmedium	PAA, Linz, AU
NaCl/HEPES-Puffer	0,01 M HEPES 0,15 M NaCl pH 7,2
PBS (steril) (MHH-Apotheke, Hannover)	56,8 mM Na_2HPO_4 x 12 H_2O 17,9 mM KH_2PO_4 75 mM NaCl
PPLO-Agar	Difco, Detroit, MI, U.S.A. + 20% Pferdeserum

PPLO-Nährmedium	Difco, Detroit, MI, U.S.A. + 20% Pferdeserum
SPG-Lösung	0,01 M NaH_2PO_4 x H_2O 5 mM Glutamat 0,25 M Saccharose pH7,4
Trypsin/EDTA	Bichrom KG, Berlin 0,05% Trypsin 0,02% EDTA

3.5 Puffer und Lösungen

3.5.1 Lösungen zur Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer	10,89 g Tris 5,5 g Borsäure 4 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 Aqua dest. ad. 1l
5 x Stopppuffer	22 g Saccharose 18 ml 0,1 M EDTA, pH 8,0 25 mg Bromphenolblau 14,4 ml Aqua dest.

3.5.2 Lösungen und „Kits“ zur DNA-Isolierung

Ammoniumacetat-Lsg., 5 M	Ambion, Austin, Texas, U.S.A.
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Stratagene, La Jolla, CA
Phenol/Chloroform/Isoamyl-alkohol (25:24:1)	Ambion, Austin, Texas, U.S.A.
Proteinase K-Puffer	85 µl STE-Puffer 10 µl Tween 20 (5%) 5 µl Proteinase K-Lösung (19,6 mg/ml)
QIAEX II Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp Blood Kit	Qiagen, Hilden
STE-Puffer	0,1 mM EDTA, pH 8,0 1 mM Tris, pH 8,0 10 mM NaCl
TaqMan Gold RT-PCR-Kit	Applied Biosystems, Darmstadt

TE-Puffer	10 mM Tris HCl, pH 7,4 1mM EDTA, pH 8,0 pH 7,5
TRIzol Reagenz	Invitrogen/Life technologies, Karlsruhe

3.5.3 Lösungen für Immunfluoreszenz-Färbungen

Tris-Puffer für IF	0,05 M Tris, pH 7,4 0,1 M NaCl

3.5.4 Lösungen für den Immunperoxidase-Assay

4-Chloro-1-naphthol-Stammlsg.	32 mg Tablette in 10 ml Methanol abs.
Färbe-Reagenz für IPA	10 ml Triethanolamin-Puffer 2 ml 4-Chloro-1-naphthol-Stammlsg. 5 µl 30% H_2O_2
PBS für IPA	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na_2HPO_4 0,2 g KH_2PO_4 pH 7,4
Triethanolamin-Puffer	7,5 g NaCl 2,8 ml Triethanolamin 17 ml 1M HCl pH 7,5

3.5.5 Lösungen für den PGE_2-ELISA

Lösung A	0,2 M Na_2CO_3
Lösung B	0,2 M $NaHCO_3$
Coating-Puffer (0,05 M Carbonat-Puffer)	10 ml Lösung A 40 ml Lösung B 150 ml Aqua dest pH 9,6
PBS nach Dulbecco	9,55 g PBS nach Dulbecco ad 1 l Aqua dest.
TMB-Stammlösung	1 mg Tablette 3,3´,5,5´-Tetramethyl-Benzidin (TMB) in 1 ml DMSO, wasserfrei
TMB-Substrat	1ml TMB-Stammlösung 9 ml Substratpuffer

Substratpuffer (Citronensäure-Acetat-Puffer)	100 mM Na-acetat 100 mM Citronensäure ad 100 ml Aqua dest. pH 4,9
Waschpuffer	500 ml PBS (Dulbecco) 0,1 g Tween 20

3.5.6 Lösungen für die Elektronenmikroskopie

2% PTA/2% BSA	Phosphowolframsäure 2%, pH 7 und BSA 2% (1 : 1) Calciumchlorid $CaCl_2$ 10 mM

3.6 Enzyme und Proteine

Bovines Serum Albumin, Fraktion V	Sigma, Deisenhofen
Fötales Kälberserum SO 215	Biochrom KG, Berlin
*Hpa*I-Restriktionsendonuclease	New England Biolabs, Frankfurt
LD-Taq-Polymerase	Perkin Elmer, Foster City, CA, U.S.A.
Proteinase K, PCR grade	Roche, Mannheim
Red-Taq-Polymerase	Sigma, Deisenhofen
RQ1-DNaseI (RNase-frei)	Promega, Madison, WI, U.S.A.

3.7 Antikörper

Polyklonales Antiserum	Serum-Isolat eines Patienten mit Chlamydia-spezifishem IgG Titer (> 1 : 256)
Goat-anti-human-IgG-Antiserum (γ-chain specific), Peroxidase-gekoppelt	Sigma, Deisenhofen
FITC-konjugierter-anti-MOMP	Syva Microtrak, Palo Alto, U.S.A.
Immunfluoreszenztest IMAGEN^{TM} *C. pneumoniae*	DAKO, Hamburg

3.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Fa. MWG Biotech synthetisiert und aufgereinigt.

3.8.1 Mycoplasmen-16S rDNA-spezifische Primer

(WIRTH et al., 1994)

Mycoplasmen-PCR-Primer; „outer-set“

```
Myco-9-1  5´-CGCCTGAGTAGTACGTTCGC-3´
Myco-9-2  5´-CGCCTGAGTAGTACGTACGC-3´
Myco-9-3  5´-TGCCTGAGTAGTACATTCGC-3´
Myco-9-4  5´-CGCCTGGGTAGTACATTCGC-3´
Myco-9-5  5´-CGCCTGAGTAGTATGCTCGC-3´
Myco-9-6  5´-TGCCTGGGTAGTACATTCGC-3´

Myco-3-1  5´-GCGGTGTGTACAAGACCCGA-3´
Myco-3-2  5´-GCGGTGTGTACAAAACCCGA-3´
Myco-3-3  5´-GCGGTGTGTACAAACCCCGA-3´
```

Mycoplasmen-PCR-Primer; „nested-set“

```
Myco-8-1  5´-TGGTGCATGGTTGTCGTCAG-3´
Myco-8-2  5´-TGGTGCACGGTTGTCGTCAG-3´

Myco-5-1  5´-GAACGTATTCACCGCAGCATA-3´
Myco-5-2  5´-GAACGTATTCACCGCGACATA-3´
Myco-5-3  5´-GAACGTATTCACCGTAGCGTA-3´
Myco-5-4  5´-GAACGTATTCACCGCAGCGTA-3´
Myco-5-5  5´-GAACGTATTCACCGCAGTATA-3´
Myco-5-6  5´-GAACGTATTCACCGCAACATG-3´
Myco-5-7  5´-GAACGTATTCACCGCGACATG-3´
```

3.8.2 Humane cox-2-Gen-spezifische Primer

(HUMAR, et al., 2000)

```
5´-Cox-2  5´-GCCCTTCCTCCTGTGCC-3´
3´-Cox-2  5´-AATCAGGAAGCTGCTTTTTAC-3´
```

3.8.3 Humane RPS9-spezifische Primer

(HESS et al., 2001)

```
RibProtS9 5´   5´-CGCAGGCGCAGACGGTGGAAGC-3´
RibProtS9 3´   5´-CGAAGGGTCTCCGCGGGGTCACAT-3´
```

3.9 Bakterien

3.9.1 Chlamydia trachomatis-Stämme

Serovar	Bezeichnung	Bezugsdatum	Bezugsquelle
A	G-17/OT H_{17}	1997	WRF
Ba	VR347	1986	ATCC
D	UW-3/CX H_{20}	1997	WRF
F	VR 346	1986	ATCC
G	VR 878	1986	ATCC
I	VR 880	1986	ATCC
K	UW-31/CX H_{39}	1997	WRF
K	UW-31/CX	1989	WRF
LGV 1	VR 901B	1986	ATCC

3.9.2 Chlamydophila pneumoniae-Stämme

Nr.	Bezeichnung	Bezugsdatum	Bezugsquelle
1	VR 1310	1998	ATCC
2	VR 2282	1998	ATCC
3	VR 53 592	1998	ATCC
4	CM-1	1999	CDC
5	CWL-011	1999	CDC
6	CWL-029	1999	CDC
7	CWL-050	1999	CDC
8	FML-16	1999	CDC
9	7N	1999	CDC
10	10N	1999	CDC
11	12N	1999	CDC
12	16N	1999	CDC
13	19N	1999	CDC
14	T 2043	1999	CDC
15	T 2023	1999	CDC
16	TW 183	1999	CDC
17	Isolat: Patient MHH (Pneumonie + reA)	1998	isoliert von M. Maass, MUL

3.9.3 Mycoplasmen

Spezies	Bezeichnung	Bezugsdatum	Bezugsquelle
M. fermentans	PG 18	1998	TiHo
M. hyorhinis	BTS 7	1998	TiHo

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A
CDC	Center of Disease Control, Atlanta, Ga., U.S.A
MHH	Medizinische Hochschule Hannover, Abt. Rheumatologie
MUL	Medizinische Universität Lübeck, Institut für Mikrobiologie, Prof. M. Maass
TiHo	Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Prof. G.F. Gerlach
WRF	Washington Research Foundation, Seattle, Wash., U.S.A.

3.10 Zellkulturen

Bezeichnung	**Best.-Nr.**	**Bezugsquelle**
HEp-2-Zellen	CCL 23	ATCC
THP-1-Zellen	ACC 16	DSMZ

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung von HEp-2-Zellen

Die epidermale aus einem humanen Larynxkarzinom stammende Zellinie HEp-2 (MOORE et al., 1955) wurde für die Anzucht von *Chlamydia trachomatis* und zur Untersuchung der Persistenz von *Chlamydia trachomatis* eingesetzt. Die adhärent wachsenden Zellen wurden in Kulturmedium bei 37°C unter 5% CO_2-Atmosphäre in einem Brutschrank kultiviert. Nach der Ausbildung eines lückenlosen Zellrasens wurden die Zellen abgelöst und 1:4-verdünnt neu ausgesät. Dazu wurden sie einmal mit PBS gespült, bis zu ihrer Ablösung mit 2-4 ml einer 0,05% Trypsin/0,02% EDTA-Lösung bedeckt und anschließend mit 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert.
Die Zellen wurden maximal 4 Wochen in Kultur gehalten und für Versuche benutzt. Sie wurden regelmäßig mittels PCR (siehe 4.8.6) auf mögliche Kontamination durch Mycoplasmen überprüft.

4.1.2 Kultivierung und TPA-Differenzierung von THP-1-Zellen

Zur Untersuchung der Persistenz in monozytären Zellen wurde die humane monozytäre Vorläufer-Zelllinie THP-1 (TSUCHIYA et al., 1980) verwendet. Die Kultivierung der Suspensionszellen erfolgte in Kulturmedium bei 37°C unter 5% CO_2-Atmosphäre in einem Brutschrank bei einer Zelldichte von 5 – 10 x 10^5 Zellen/ml. Alle 3 – 4 Tage wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt.
Vor Infektion der Zellen mit *Chlamydia trachomatis* wurden diese 3 Tage lang mit 5 x 10^{-7} M Phorbolester TPA behandelt, um die Differenzierung in ein makrophagenähnliches adhärentes Stadium zu induzieren.
Wie HEp-2-Zellen wurden auch die THP-1-Zellen maximal 4 Wochen für Versuche in Kultur gehalten und regelmäßig mittels PCR (siehe 4.8.6) auf mögliche Kontamination durch Mycoplasmen überprüft.

4.1.3 Zellzahlbestimmung

Gleiche Volumina einer Zellsuspension und einer 0,05%igen Trypanblau-Lösung wurden gemischt und 10 µl davon zur Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Aus 4 x 16 ausgezählten Kleinquadraten (=4 Großquadrate) errechnet sich die Zellzahl wie folgt:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen von 4 Großquadraten}}{\text{4 (Zahl der Großquadrate)}} \times \text{Verdünnungsfaktor } 2 \times 10^4$$

4.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen für 10 min bei 200 x g zentrifugiert und das Zell-Pellet in eisgekühltem Einfriemedium in einer Dichte von 5 x 10^6 Zellen/ml resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurden in Kryoröhrchen für 24 Stunden in einem Cryo-Freezing-Container bei –80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei –196°C gelagert.
Nach dem Auftauen auf Eis wurden die Zellen in 40 ml Kulturmedium resuspendiert, sofort bei 200 x g pelletiert, wieder in Wachstumsmedium aufgenommen (HEp-2-Zellen: ca. 20 ml; THP-1-Zellen: ca. 3 ml) und in Kulturflaschen ausgesät.

4.1.5 Präparation und Kultur von humanen peripheren Blutmonozyten

Die humanen peripheren Blutmonozyten wurden entweder aus Leukozyten-Konzentraten der Blutbank der Medizinischen Hochschule Hannover oder aus Vollblut gesunder Blutspender isoliert. Vollblut konnte unverdünnt verwendet werden, Leukozytenkonzentrate wurden 1 : 3 mit HANK´s-Lösung verdünnt. Als Gerinnungshemmer wurde 1,6 mg EDTA/ml Blut verwendet. Das Vollblut oder verdünnte Leukozytenkonzentrat wurde in LEUCOSEP®-Röhrchen auf Lymphozyten-Separationslösung geschichtet und 15 min bei 1000 x g zentrifugiert. Danach wurde die leukozytenhaltige, dem Separationsmedium überlagerte Schicht abgegossen, 1:2 mit HANK´s Lösung verdünnt und 10 min bei 800 x g pelletiert. Das Pellet wurde 2x mit HANK´s Lösung gewaschen (Zentrifugation 10 min bei 250 x g), anschließend in Kulturmedium oder serumfreiem Medium aufgenommen und in Kulturschalen ausgesät. Die gemischte Leukozytenfraktion wurde für 60 min bei 37°C in den Brutschrank gestellt. In dieser Zeit adhärierten die Monozyten an der Plastikoberfläche der Kulturschale. Die übrigen Zellen wurden anschließend durch mehrmaliges Waschen mit HANK´s-Lösung abgespült, während die Monozyten in den Kulturschalen verblieben. Diese wurden mit Medium versorgt und für Infektionsversuche verwendet.

4.2 Chlamydien

4.2.1 Anzucht und Präparation von Chlamydia trachomatis

Die Anzucht von größeren Chlamydien-Mengen erfolgte in HEp-2-Zellen. Dazu wurden ca. 5 x 10^7 infektiöse Einheiten von *Chlamydia trachomatis* in 10 ml Infektionsmedium auf einen dicht bewachsenen HEp-2-Zellrasen in einer 182 ml Gewebekulturflasche gegeben und 45 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler leicht geschwenkt. Anschließend wurden weitere 20 ml Infektionsmedium zugegeben und die Kultur im Brutschrank bei 37°C/5% CO_2 für 48 Std. inkubiert. Danach wurden die Zellen mit den entwickelten chlamydialen Einschlusskörperchen mit Hilfe von sterilen Glasperlen in 10 ml Infektionsmedium vom Boden der Kulturflasche gelöst und samt Medium in ein 50 ml Röhrchen mit Glasperlen überführt. Durch kräftiges Schütteln und eine 2 minütige Behandlung im Ultraschallbad wurde der Großteil der Zellen zerstört und die Chlamydien freigesetzt. Diese wurden zur Infektion weiterer HEp-2-Zellkulturen verwendet. Nach weiteren 48 Std. Inkubationszeit erfolgte eine weitere Passage auf neue HEp-2-Zell-Monolayer. Auf diese Weise gelingt es 20 infizierte Kulturflaschen zu generieren, die zur Präparation von *Chlamydia trachomatis* Elementarkörperchen verwendet werden.

Die Aufreinigung der Chlamydien erfolgte in Anlehnung an die Methode von CALDWELL et al. (1981). Der Kulturüberstand der infizierten Zellen wurde durch je 10 ml kalte HANK´s-Lösung pro Flasche ersetzt. Mit Hilfe von sterilen Glasperlen wurden nun die Zellen vom Flaschenboden gelöst, die Zell-Chlamydien-Suspensionen aller Flaschen gepoolt und in 30 ml-Portionen in 50 ml Röhrchen mit Glasperlen für 5 – 10 min auf höchster Stufe geschüttelt, 2 min im Ultraschallbad behandelt und weitere 5 min geschüttelt. Auf diese Weise wurden die Chlamydien aus den Zellen freigesetzt. Anschließend wurden die groben Zelltrümmer der so gewonnenen Suspension durch Zentrifugation entfernt (20 min, 800 x g, 4°C). Der chlamydienhaltige Überstand wurde auf 8 ml einer 35%igen Urographinlösung in HEPES/NaCl geschichtet und für 1 Std. bei 43.000 x g bei 4°C ohne Bremse sedimentiert. Die im Pellet befindlichen Chlamydien wurden in SPG-Puffer resuspendiert und, um noch vorhandenes Urographin auszuwaschen, nochmals bei 30.000 x g für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend erneut in SPG-Puffer aufgenommen und in 50 µl Portionen bei –80°C gelagert.

4.2.2 Aufzucht und Präparation von Chlamydophila pneumoniae

Die Anzucht von *Chlamydophila pneumoniae* erfolgte ähnlich, wie für *Chlamydia trachomatis* beschrieben. Dem Entwicklungszyklus von *CP* angepasst, wurde die Kultur bei 35°C und 5% CO_2 auf 72 – 96 Std. verlängert. Die Beurteilung des Infektionserfolges ist bei *CP* deutlich schwieriger als bei *CT*. Die Einschlusskörperchen sind während der Kultur nur sehr schwer lichtmikroskopisch zu erkennen. Bei höheren Infektionsraten sind chlamydiale EK in abgelösten und aufgeblähten Zellen zu beobachten.
Alle Arbeitsschritte erfolgten unter Einhaltung der entsprechenden Sicherheits-Bedingungen, da der Keim aerosolübertragbar ist.

4.3 Mycoplasmen

Die Mycoplasmen (*M. fermentans* und *M. hyorhinis*) wurden in PPLO-Nährmedium bei 37°C/5% CO_2 angezüchtet und aliquotiert bei -20°C eingefroren. Zur Bestimmung der Vitalität der eingefrorenen Mycoplasmen nach Reaktivierung wurde eine Verdünnungsreihe nach ALBERS & FLETCHER (1982) angelegt und je 10 µl der Verdünnungen auf PPLO-Agar-Platten aufgetropft. Nach Inkubation der Platten bei 37°C/5%CO_2 für 10 Tage wurden die entwickelten Kolonien am Olympus CK 40-Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Koloniezahl wurde als CFU/ml angegeben.

4.4 Mupirocin-Behandlung

Zur Therapie von Mycoplasmen-Kontaminationen wurde eine Behandlung der Chlamydien während ihres Wachstums in HEp-2-Zellen selbst entwickelt. Nach der Infektion von HEp-2-Zellen in der MOI ~0,05 mit *CP* wurden die Kulturen bis zur Vollendung des ersten Replikationszyklus der Chlamydien mit Mupirocin behandelt und wie folgt auf frische Zellen passagiert: Die infizierten Zellen wurden mit Glasperlen geerntet, die Zell-Chlamydien-Suspension mit Glasperlen auf höchster Stufe für 10 min geschüttelt, 2 min ultraschallbehandelt, weitere 2 min geschüttelt und die groben Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 800 x g bei 4°C für 20 min sedimentiert und entfernt. Vom chlamydienhaltigen Überstand wurde 1/20 des Volumens auf neue HEp-2-Monolayer gegeben und mit frischem mupirocinhaltigen Infektionsmedium versorgt. Dieses Verfahren wurde mehrfach wiederholt.

Die Behandlung erfolgte mit dem Antibiotikum Mupirocin in FCS-freiem Kulturmedium. Details zur eigens entwickelten Behandlungsmethode finden sich in Abschnitt 5.1.4 (KRAUßE-OPATZ et al., 2000).

4.5 Infektionsversuche

4.5.1 Infektion von HEp-2-Zellen mit Chlamydien

HEp-2-Zellen wurden in verschiedenen Kulturgefäßen zur Entwicklung eines konfluenten Monolayers ausgesät. Nach der Bestimmung der Zellzahl pro Kulturgefäß wurde die Zahl der notwendigen Chlamydien entsprechend der anzuimpfenden MOI errechnet und eine entsprechend verdünnte Chlamydiensuspension in Infektionsmedium zugegeben. Die Zellen wurden bei für 20 min bei 380 x g *(CT)* oder 45 min bei 750 x g *(CP)* zentrifugiert und anschließend für 2 Std. bei 37°C *(CT)* oder 35°C *(CP)* im Brutschrank inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit HANK´s Lösung erhielten die Zellen Infektionsmedium und wurden weiterhin für 2 Tage (*CT*) oder 3 – 4 Tage (*CP*) kultiviert. Danach konnten die Zellen durch Trypsinierung geerntet oder direkt im well gefärbt werden.

4.5.2 Infektion von HEp-2-Zellen mit Mycoplasmen

6-Loch-Schalen und 8-Loch-Chamber-Slides wurden mit HEp-2-Zellen zur Entwicklung von konfluenten Monolayern beimpft und diese anschließend mit *Chlamydophila pneumoniae* in den MOI 0,05; 0,005 und 0,0005 infiziert. Zu jeder *CP*-Infektion wurden verschiedene CFU an *Mycoplasma fermentans* oder *M. hyorhinis* zugegeben, so dass sich das initiale Verhältnis *CP* : Mycoplasmen 10:1, 1:1 und 1:10 ergab. Als Kontrollen dienten HEp-2-Zellen, die nur mit den entsprechenden CFU an *M. fermentans* oder *M. hyorhinis* infiziert wurden und Zellen, die nur mit *CP*, aber ohne Mycoplasmen infiziert wurden. Die Bakterienspezies wurden gleichzeitig zu den Zellen gegeben und die Infektion wie in (4.5.1) beschrieben durchgeführt.

Bei der Ernte nach 3-4 Tagen wurde von den Chamber-Slides nur das Medium entfernt und die Zellen mit eiskaltem Methanol fixiert und anschließend getrocknet. Die Zellen in den Kulturschalen wurden durch Trypsinierung geerntet und Zellpellets, sowie Proben für den Immunoperoxydase-Assay und Cytopräparate hergestellt.

4.5.3 Infektion von THP-1-Zellen mit Chlamydia trachomatis

THP-1-Zellen wurden zur Differenzierung und Ausbildung eines Monolayers wie in (4.1.2) beschrieben in einer Dichte von 8 x 10^4 Zellen pro well in 96 well Schalen ausgesät. Nach 3-tägiger Inkubation wurden sie mit HANK´s-Lösung gewaschen und mit Normalmedium versorgt. Zur Infektion wurde eine entsprechend der MOI verdünnte *Chlamydia trachomatis*-Suspension in Normalmedium zugegeben und die Zellen analog den HEp-2-Zellen zentrifugiert. Brutschrankinkubation und weitere Kultur erfolgten analog den in (4.1.1) beschriebenen HEp-2-Zellen. Nach 2 Tagen wurden die Zellen wie im IPA-Protokoll beschrieben fixiert und gefärbt.

4.5.4 Infektion von HPBM mit C. trachomatis oder C. pneumoniae

Die wie in (4.1.5) beschrieben präparierten humanen peripheren Blutmonozyten wurden mit verdünnten Chlamydien-Suspensionen entsprechend einer MOI von 1, 3, 5 oder 10 versetzt und im Brutschrank bei 35°C (*CP*) oder 37°C (*CT*) für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die nicht in die Zellen eingedrungenen Chlamydien durch 3-maliges Waschen mit HANK´s-Lösung abgewaschen und die Zellen mit DC-Medium versorgt.

4.5.5 Stimulation HPBM mit LPS

Die Stimulation HPBM mit *E. coli*-Lipopolysaccharid stellt ein starkes Signal zur Synthese von Prostaglandin E_2 dar. Dies diente in den Versuchen zur Untersuchung der monozytären PGE_2-Synthese als Positivkontrolle. *E. coli*-LPS wurde in der Konzentration von 10 µg/ml in Medium zu den Monozyten gegeben. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Überstände wurden für die Dauer-Versuche nach 2, 6, 24, 48, 72, 120, 168 und 240 Stunden entnommen und jeweils durch frisches Kulturmedium ersetzt. Bei den Kontrollen der Versuche zur PGE_2-Synthese an Tag 1, Tag 3 (und Tag 6) nach der Stimulation verblieb das Medium bis zur jeweiligen Ernte auf den Zellen.

4.5.6 IFNγ-Einfluss auf Infektionen von HEp-2-Zellen mit C. trachomatis

Für die Experimente, bei denen eine mehrtägige Vorinkubation der HEp-2-Zellen mit verschiedenen Chemikalien notwendig war, wurden die Zellen so dünn ausgesät, dass sie erst nach Beendigung der Vorinkubations-Phase einen Monolayer ausgebildet hatten. Bei einer 4-tägigen Wachstumsphase vor der Infektion wurden 6,25 x 10^3 Zellen pro Vertiefung einer 96-well-Schale ausgesät. Nach einem Tag

wurden die Zellen zur Vorinkubation mit Interferon γ-haltigem Medium versorgt. Nach weiteren 2 Tagen wurde das Medium noch einmal gewechselt. Nach dem dritten Vorinkubations-Tag erfolgte die Infektion der Zellen mit *Chlamydia trachomatis* (MOI 0,001), wie in (4.5.1) beschrieben. Nun wurde weitere 2 Tage lang mit Interferon γ-haltigem Infektionsmedium (enthält 1µg/ml Cycloheximid) inkubiert. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen und die Anfärbung der Einschlußkörper mittels IPA (vgl. 4.6.1). Die Zahl der entwickelten Einschlusskörper pro well wurde nun mikroskopisch ausgezählt.

4.5.7 IFNγ-Einfluss auf Infektionen von THP-1-Zellen mit C. trachomatis

THP-1-Zellen wurden vor der Vorinkubation drei Tage lang TPA-differenziert (vgl. 4.1.2) und anschließend mit HANK´s-Lösung gewaschen. Danach erfolgte die dreitägige Vorinkubation der Zellen mit IFNγ-haltigem Medium. Nach zwei Tagen wurde ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt. Die Infektion mit *Chlamydia trachomatis* (MOI 0,004) wurde wie in (4.5.3) beschrieben durchgeführt, nur wurden die Zellen nach der Infektion wieder mit dem IFNγ-haltigem Medium versorgt. Nach weiteren zwei Tagen erfolgte die Fixierung der Zellen, die Anfärbung der Einschlußkörper (siehe IPA) und die Auszählung der Einschlusskörper pro well.

4.5.8 *Aminosäure-, Eisen- und NO-Stoffwechsel in C. trachomatis-infizierten HEp-2 und THP-1-Zellen*

Für die chlamydiale Persistenz in epithelialen und monozytären Zellen werden verschiedene Stoffwechselwege verantwortlich gemacht. In der vorgelegten Arbeit wurden Versuche mit Produkten, bzw. Inhibitoren des Aminosäure-, Eisen- und NO-Stoffwechsels durchgeführt. Gleichzeitig mit IFNγ wurden während der dreitägigen Vorinkubations-Phase Eisensulfat ($FeSO_4$), Deferoxamin (DFO), L-Tryptophan, 6-Chloro-D,L-Tryptophan, L-Alanin, L-Phenylalanin, L-Arginin, N-Methyl-L-Arginin (L-NMMA) und N-Methyl-D-Arginin (D-NMMA) zugesetzt. Die Substanzen wurden in Kulturmedium gelöst und sterilfiltriert. In einigen Fällen dauerte der Lösungsprozess lange, wie beim L-Tryptophan und insbesondere beim 6-Chloro-D,L-Tryptophan. Dann wurde das Medium im Wasserbad auf 37°C erwärmt und einige Male lichtgeschützt ultraschallbehandelt, um die Substanz zu zerkleinern. Nach 2 – 3 Stunden war sie vollständig gelöst. Ein Lösen in DMSO wurde vermieden, denn DMSO beeinflusst die chlamydiale Infektiösität und damit das auszuwertende Anzeige-System dieser Experimente. Nach dem Ansatz der Lösungen wurden diese

zu den Zellen gegeben und die Experimente fortgesetzt, wie in (4.5.6 , bzw. 4.5.7) beschrieben.

4.5.9 Einfluss von Fe^{2+}-Ionen auf die chlamydiale Persistenz in Monozyten

Die Wirkung zweiwertiger Eisenionen sollte auch in *Chlamydia trachomatis* infizierten humanen peripheren Blutmonozyten (HPBM) untersucht werden. Dazu wurden HPBM aus peripherem Blut gewonnen (vgl. 4.1.5) und in Normalmedium mit 5% FCS unter Zusatz von verschiedenen Konzentrationen von $FeSO_4$ (50, 100 und 200 µM) für 2, 5, 8 und 18 Tage bei 37°C in 6-well-Schalen inkubiert. Kontrollmonozyten wurden ohne Zusatz von $FeSO_4$ inkubiert. Nach der Ernte der Monozyten wurden diese aus den Kulturschalen ins Medium abgeschabt, die Suspension durch Schütteln homogenisiert und bei –80°C eingefroren. Die Infektiösität dieser Monozyten-Suspensionen wurde mittels Immunoperoxydase-Assay bestimmt. (vgl. 4.6.1).

4.6 Nachweismethoden für Chlamydien

4.6.1 Nachweis infektiöser Chlamydien (Immunoperoxydase-Assay / IPA)

Die Bestimmung infektiöser Chlamydien erfolgte über die Titration von Chlamydiensuspensionen oder Zelllysaten auf konfluente HEp-2-Zell-Monolayer. Nach 48-stündiger *(CT)*, bzw. 72 –96-stündiger *(CP)* Inkubation im Brutschrank bei 37°C *(CT)*, bzw. 35°C *(CP)* wurden die entwickelten chlamydialen Einschlusskörper angefärbt und quantifiziert (angelehnt an Methode von SHEMER und SAROV, 1985). Dabei entspricht ein Einschlußkörper einem infektiösen Elementarkörper in der Originalsuspension.

4×10^5 HEp-2-Zellen wurden je Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät und für 24 Std. bei 37°C/5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit bildeten die Zellen einen lückenlosen Zellrasen aus. Die Proben, entweder aus präparierten Chlamydien (4.2.1 und 4.2.2) oder aus infizierten Zellen (4.5.1, 4.5.3, 4.5.4) bestehend, wurden unverdünnt und/oder in Medium verdünnt in Dreifachbestimmungen auf die Zellen gegeben. Konzentrierte Chlamydiensuspensionen wurden in einer geometrischen Reihe bis zu 10^7-fach verdünnt. Infizierte HEp-2- und THP-1-Zellen wurden vor der Verdünnung 2 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend in 3 – 4 Stufen verdünnt. Infizierte Monozyten wurden ebenfalls ultraschallbehandelt und unverdünnt, 1 : 2- und 1: 5-

verdünnt aufgetragen. Je Probe wurden 50µl Suspension auf die HEp-2-Monolayer gegeben und anschließend für 20 min bei 380 x g *(CT)* oder 45 min bei 750 x g *(CP)* zentrifugiert. Danach wurden die Zellen für 2 Std. bei 37°C *(CT)* oder 35°C *(CP)* im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 150 µl Infektionsmedium je Loch wurden die Zellen bis zur Entwicklung der reifen EK weiter bebrütet.

Zur Fixierung der EK sollten diese reif, aber noch nicht geplatzt sein. Der Kulturüberstand wurde nun aus den Löchern der Kulturschale entnommen und jeweils 100 µl kalter abs. Methanol zugegeben. Die Kulturschale wurde für 4 min bei –20°C in den Gefrierschrank gestellt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Methanol wurde nun entfernt und die fixierten Monolayer luftgetrocknet.

Die Färbung der chlamydialen Eischlusskörper erfolgte mittels Immunperoxydase-Assay (IPA). Die getrockneten Zellmonolayer wurden zur besseren Benetzung vor der Zugabe des Primärantikörpers einmal mit PBS/0,01% Triton-X100 gespült. Anschließend wurden je 75 µl hochtitriges polyklonales Antiserum (von einem Patienten mit einem hohen antichlamydialen spezifischen IgG Titer > 1:256) 1:200 in warmem PBS/0,01% TritonX-100 verdünnt in jedes Loch gegeben. Die Kulturschale wurde über Nacht bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Proben wurden nun 3 x für je 15 min mit PBS/0,01% Triton X-100 bei RT gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von je 75 µl 1:100 mit PBS/0,01% Triton X-100 verdünntem Peroxydase-gekoppeltem Sekundärantikörper aus Ziege (goat-anti-human-IgG-Antiserum; γ-Ketten-spezifisch). Die Inkubation erfolgte für ca. 4-6 Stunden bei 37°C oder bei 4°C über Nacht unter Schwenken. Alle Löcher wurden nun 1 x mit PBS/0,01% Triton X-100 und 2 x mit PBS gewaschen. Die Anfärbung erfolgte nun mit 75 µl des 4-chloro-1-naphthol-haltigen Färbereagenzes für IPA. Die Peroxydase setzt dabei 4-Chloro-1-naphthol innerhalb von 5 – 10 min zu einem dunkelblauen bis schwarzen Farbstoff um. Nach dieser Zeit wurde das Reagenz entfernt und die Proben zweifach mit PBS gewaschen. Zur Kontrolle der Färbung wurden bei jedem Test sowohl nicht infizierte Zellen, als auch mit einer bereits bestimmten Chlamydien-Dosis infizierte Zellen mitgefärbt.

Die Einschlusskörper je Loch wurden nun am Olympus CK 40 Mikroskop ausgezählt. Sie wurden als infektiöse Einheiten (inclusion forming units; IFU) je µl chlamydialer Ausgangssuspension oder als IFU je 10^5 Wirtszellen angegeben.

4.6.2 Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen

4.6.2.1 Fixierung der Zellen für die Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden entweder Cytopräparate auf Glasobjektträgern oder Zellkulturen auf Kammerdeckel-Objektträgern aus Glas verwendet.

Zur Herstellung von Zytopräparaten wurden 100 µl von Suspensionen von 5 bis 10 x 10^4 Zellen für 4 min bei 700 rpm (Shandon-Zytozentrifuge) auf Glasobjektträger zentrifugiert und anschließend über Nacht an der Luft getrocknet. Zellkulturen auf Kammerdeckel-Objektträgern wurden nach Entzug des Mediums luftgetrocknet. Anschließend wurden die Präparate für 10 min mit eiskaltem abs. Methanol fixiert. Nach Entfernung des Methanols wurden die Präparate luftgetrocknet und waren nun bereit für die direkte oder indirekte Immunfluoreszenz-Färbung.

4.6.2.2 Direkter Immunfluoreszenzmikroskopischer Test für *CT*

Für den direkten IF-Test wurde ein FITC-konjugierter monoklonaler Antikörper verwendet, der gegen ein Epitop auf dem chlamydialen MOMP (major outer membrane protein) sowohl von EK als auch von RK aller chlamydialen Serovare von *Chlamydia trachomatis* gerichtet ist (CLES et al., 1988).

Zur Färbung wurde der Antikörper 1:10 mit Tris-Puffer für die Immunfluoreszenzmikroskopie verdünnt und auf die methanolfixierten Präparate gegeben. Nach Inkubation für 1 Std. in einer feuchten Kammer bei RT wurden die Präparate zweifach mit Aqua dest. gewaschen, an der Luft getrocknet und mit Mountingfluid und Corbitbalsam eingedeckt. Um ein unspezifisches Binden der Antikörper auszuschließen, bzw. zu erkennen wurden auch nicht infizierte Zellen zur Kontrolle mitgefärbt. An einem Leica Biomed Fluoreszenzmikroskop mit der Anregungswellenlänge 495 nm und einem 520 nm Grenzfilter wurden die Präparate ausgewertet. Die Wirtszellen stellten sich durch den im Antikörper-Lyophilisat enthaltenen Farbstoff Evans Blue rotbraun dar. Chlamydiale Einschlüsse erschienen unter UV-Licht mit einem 520 nm Grenzfilter leuchtend grün.

4.6.2.3 Direkter Immunfluoreszenzmikroskopischer Test für *CP*

Zur Färbung von *Chlamydophila pneumoniae* Einschlusskörpern wurde ein FITC-konjugierter *CP*-spezifischer monoklonaler Antikörper (IMAGEN™ *Chlamydophila pneumoniae*-Test) nach Anweisung des Herstellers benutzt.

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen wurden nicht infizierte Zellen zur Kontrolle mitgefärbt.

4.7 Bestimmung von PGE2 und Zytokinen in HPBM-Kultur-Überständen

4.7.1 PGE2-ELISA

Prostaglandin E_2 wurde in Monozyten-Kultur-Überständen durch einen kompetitiven ELISA bestimmt. In diesem Test konkurriert PGE_2 mit biotinyliertem PGE_2 um die Bindungsstelle eines spezifischen monoklonalen Antikörpers. Ein Streptavidin-Peroxydase-Konjugat ermöglicht die Detektion von Biotin über die Synthese eines gefärbten Reagenzes.

NUNC®-Maxisorp-Platten wurden mit einem polyklonalen Ziege-anti-Maus-IgG (1 : 2.000 in Coating-Puffer) für 20 Std. bei Raumtemperatur beschichtet. Anschließend wurde dreimal mit Waschpuffer (PBS/0,02% Tween 20) gewaschen. Eine Mischung aus 50 µl Probelösung, 50 µl des monoklonalen Anti-PGE_2-Antikörpers (1 : 100 in PBS/0,1% BSA) und 50 µl des PGE_2-Biotin-Konjugats (1 : 200 in PBS/0,1% BSA) wurde zugegeben, über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS/Tween 20-Puffer gewaschen. Eine Reihe von Standard-PGE_2-Lösungen im gleichen Medium, eine Negativkontrolle (PBS/0,1% BSA) und eine PGE_2-Biocytin-Kontrolle ohne PGE_2 wurden zur Absicherung des Tests mitgeführt. Die Proben wurden nun mit frisch angesetztem Streptavidin-POD-Konjugat (1 : 50.000 in PBS/0,1% BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal mit PBS/Tween20-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das TMB-Substrat zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit 2M Schwefelsäure gestoppt und die OD_{450} innerhalb der folgenden 2 Std. gemessen.

4.7.2 Cytokin-ELISA´s

Die Zytokine IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IL-12p75, IFNγ and TNFα wurden aus den Überständen von HPBM-Kulturen durch ELISA-Technik nachgewiesen. Dazu wurden die bei –80°C tiefgefrorenen Kulturüberstände an das Labor von Dr. med. T. Höhler, 1. Med. Klinik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz versendet. Dort wurden die ELISA´s durchgeführt.

4.8 Molekularbiologische Methoden

4.8.1 Aufreinigung von DNA

Die Isolierung der DNA aus Zellpellets erfolgte mit dem QIAmp Blood Kit der Firma Qiagen. Dabei wurden Zellextrakte durch Lyse und Protease-Behandlung von Zellpelletts gewonnen und die DNA durch Adsorption an Silika-Membranen in Säulen aufgereinigt. Nach Waschschritten erfolgt die Elution der DNA von den Säulen mit einem speziellen Puffer. Die genaue Durchführung der Präparation kann dem Benutzerhandbuch entnommen werden.

Die DNA zum Nachweis von Mycoplasmen wurde mit dem Qiaex II Kit der Firma Qiagen präpariert. Die Extraktion und Reinigung basiert auf der selektiven, quantitativen Adsorption der DNA an Silikagelpartikel in Anwesenheit hoher Salzkonzentration. Eluiert wird die DNA mit Wasser nach mehreren Waschschritten. Eine genaue Beschreibung der Aufreinigung ist im entsprechenden Handbuch aufgeführt.

4.8.2 Aufreinigung von RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Monozyten erfolgte unter Verwendung von TRIzol-Reagenz der Firma Life-Technologies. TRIzol, ein Gemisch aus Phenol und Guanidinium-thiocyanat führt zur Lyse der Zellen und zur Hemmung der RNasen. Aus jeder Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte wurde das Medium abgezogen und die darin enthaltenen Suspensionszellen bei 230 x g pellettiert und in 200µl Trizol-Reagenz aufgenommen. Die am Schalenboden haftenden adhärenten Zellen wurden mit Gummischabern und je 1 ml TRIzol-Reagenz abgelöst. Die suspendierten und adhärenten Zellen einer Vertiefung wurden dann gepoolt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Poben bei –80°C eingefroren.
Zur Isolierung der RNA wurden nun 0,24 ml Chloroform zu den lysierten Zellen gegeben, die Proben für 15 s kräftig geschüttelt und 2-3 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde die Suspension 15 min bei 12.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Die RNA wurde aus der oberen wässrigen Phase mit 0,6 ml Isopropanol für 10 min bei RT gefällt. Nach Zentrifugaton für 10 min bei 12.000 x g und 4°C wurde das Pellet mit 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 5 – 15 µl DEPC-H_2O aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit wurden über Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm kontrolliert.

4.8.3 DNaseI-Verdau

Zur Verhinderung von falsch positiven Ergebnissen in RT-PCR´s durch kontaminierende DNA wurde die in RNA-Präparationen in geringen Mengen enthaltene DNA entfernt. Dazu wurden die Proben vor der reversen Transkription einem DNase-Verdau unterzogen. Es wurde RNase freie RQ1-DNase verwendet. Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

5 µg RNA
2 µl 10 x DNase-Puffer
5 U DNaseI
ad 20 µl mit DEPC-H_2O

Der Verdau fand für 45 min bei 37°C statt. Inaktiviert wurde die DNase, indem der Ansatz mit EGTA in einer Konzentration von ≥ 2 mM (=2,2 µl 25 mM EGTA/20 µl Verdau) inkubiert und für 10 min bei 65°C erhitzt wurde. Anschließend wurde mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und mit Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) reextrahiert. Nach einer Alkoholfällung und anschließender Wäsche wurde das Pellet ca. 15 min an der Luft getrocknet und in DEPC-H_2O aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit wurden nochmals über Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm kontrolliert.
Um die Vollständigkeit des DNaseI-Verdaus zu überprüfen, wurde ein Aliquot der Proben in die PCR zum Nachweis der entsprechenden DNA eingesetzt. Eine Weiterverarbeitung der Proben erfolgte erst nach einem negativen PCR-Ergebnis.

4.8.4 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

Die Reverse Transkription wurde mit dem Taqman Gold RT-PCR Kit durchgeführt. Der Reaktionsmix wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen angesetzt. In 100 µl Probenvolumen waren 60 ng – 2 µg RNA enthalten, sowie 1x RT-Puffer, 5,5 mM MgCl, 500 µM pro dNTP eines deoxy NTP-Mix, 2,5 µM Random Hexamer Primer, 0,4 U/µl RNase Inhibitor und 3,125 U/µl MultiScribe Reverse Transcriptase.
Die Proben wurden zur besseren Primer-Template-Bindung für 10 min bei 25°C und zur reversen Transkription für 60 min bei 37°C behandelt. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 5 min bei 95°C inaktiviert. Danach konnten die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei –15 bis –25°C gelagert werden.

4.8.5 Real-time PCR

Mit Hilfe der Real-time-PCR sollte die Expressionsstärke der cox-2-Gene in infizierten, vs. nicht infizierten Monozyten anhand der Menge gebildeter cox-2-mRNA-Moleküle bestimmt werden.

Dazu wird von geernteten Monozyten-Präparationen die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Die Ergebnisse für die cox-2-real-time-PCR wurden auf die Ergebnisse eines parallel amplifizierten housekeeping-Gens bezogen und damit der relative Anteil gebildeter cox-2-mRNA-Moleküle pro housekeeping-Äquivalent bestimmt.

Zur Durchführung der cox-2-real-time-PCR wurde das ABIPrism® 7700 Sequence Detection System der Firma Applied Biosystems verwendet. Abhängig von der Template-Konzentration zu Beginn einer PCR kommt es zu einer schnelleren oder langsameren Amplifikat-Anreicherung. Die amplifizierte DNA wird durch Einlagerung des im PCR-Mix vorhandenen interkalierenden Farbstoffes SYBR® Green markiert. Während der gesamten PCR kann so die Menge des gebildeten Produktes anhand der Zunahme des Fluoreszenzsignals detektiert werden. Die Quantifizierung erfolgt über die Kinetik der PCR-Reaktion. In den frühen PCR-Zyklen findet eine weitgehend exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. Den Zyklus, nach dem der Mittelwert des Fluoreszenzsignals erstmals signifikant über einen bestimmten Schwellenwert hinaus ansteigt, bezeichnet man als *Threshold Cycle* (C_T). Definitionsgemäß ist dies das Fluoreszenzsignal aus dem Mittelwert der ersten Zyklen plus 10 Standardabweichungen. Je höher die Menge des anfänglich vorhandenen Templates ist, desto früher wird dieser Schwellenwert überschritten, desto kleiner ist also der C_T-Wert.

4.8.5.1 Ermittlung des optimalen Primer-Verhältnisses

In den Negativ-Kontrollen sollte es theoretisch nicht zu einer DNA-Amplifikation und damit nicht zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals kommen. In der Praxis liegt der C_T-Wert der Kontrollen jedoch bei ca. 39 Zyklen. Je unterschiedlicher die C_T-Werte von Probe und zugehöriger Negativkontrolle K sind, desto besser auswertbar ist die PCR. Dies hängt sehr von dem eingesetzten Primer-Verhältnis ab. Daher wurde mit einem speziellen Schema (Primer-Matrix) dieses optimale Verhältnis ermittelt.

Folgende Ansätze werden aus Primern, Template und Wasser pipettiert :

Primer-Verhältnis	Template-Menge (1:100 von 10 ng/µl)	5´-Primer (5 pmol/µl)	3´-Primer (5 pmol/µl)	H_2O
50 : 50 K	-	1,25 µl	1,25 µl	47,5 µl
50 : 50	2,5 µl	1,25 µl	1,25 µl	45 µl
50 : 300 K	-	1,25 µl	7,5 µl	41,25 µl
50 : 300	2,5 µl	1,25 µl	7,5 µl	38,75 µl
50 : 900 K	-	1,25 µl	22,5 µl	26,25 µl
50 : 900	2,5 µl	1,25 µl	22,5 µl	23,75 µl
300 : 50 K	-	7,5 µl	1,25 µl	41,25 µl
300 : 50	2,5 µl	7,5 µl	1,25 µl	38,75 µl
300 : 300 K	-	7,5 µl	7,5 µl	35 µl
300 : 300	2,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	32,5 µl
300 : 900 K	-	7,5 µl	22,5 µl	20 µl
300 : 900	2,5 µl	7,5 µl	22,5 µl	17,5 µl
900 : 50 K	-	22,5 µl	1,25 µl	26,25 µl
900 : 50	2,5 µl	22,5 µl	1,25 µl	23,75 µl
900 : 50 K	-	22,5 µl	1,25 µl	26,25 µl
900 : 300 K	-	22,5 µl	7,5 µl	20 µl
900 : 300	2,5 µl	22,5 µl	7,5 µl	17,5 µl
900 : 900 K	-	22,5 µl	22,5 µl	5 µl
900 : 900	2,5 µl	22,5 µl	22,5 µl	2,5 µl

Von diesen Ansätzen werden je 2 x 20 µl (Doppelwerte) mit je 30 µl des SYBR® *Green PCR Core Reagent* Master-Mixes versetzt. Dieser besteht aus 5 µl 10 x SYBR® PCR Puffer, 6 µl 25 mM $MgCl_2$, 4 µl dNTP-Mix (aus je 2,5 mM dATP, dCTP und dGTP und 5 mM dUTP), 0,25 µl AmpliTaq Gold (5 U/µl), 0,5 µl AmpErase UNG (1 U/µl) und 14,75 µl H_2O.

Nach der Aktivierung des „hot-Start"-Enzyms AmpliTaq-Polymerase in einem Vorzyklus (2 min 50°C/10 min 95°C) wurde die PCR mit 40 2-Schritt-Amplifikationszyklen (15 s 95°C/60 s 55°C) gestartet.

Die aus den maximalen $\Delta C_{T(K\text{-}Probe)}$-Werten ermittelten optimalen Primer-Verhältnisse wurden in den nun folgenden PCRs angewendet.

4.8.5.2 Durchführung der Real-time-PCR

Sequenzspezifische Primer zur Amplifikation der cox-2-cDNA in den optimalen Verhältnissen wurden in Volumina von 10 µl H_2O aufgenommen und mit den Proben einer Standard-cDNA-Verdünnungsreihe und der zu untersuchenden cDNA in je 10 µl H_2O in MicroAmp Optical Tubes auf Eis gemischt. Nun wurden jeweils 30 µl des SYBR® *Green PCR Core Reagent* Master-Mixes zugesetzt. In je zwei parallelen Standard- und Proben-PCR-Reihen wurden nun die real-time Ansätze von housekeeping- und cox-2-Gen amplifiziert. Die Amplifikationen wurden unter den gleichen Bedingungen, wie die Primer-Matrix-Amplifikationen durchgeführt.
Die Standardreihen-C_T-Werte aus den housekeeping- und cox-2- Amplifikationen wurden jeweils in einer Standard-Gerade gegen den dekadischen Logarithmus ihrer Konzentrationen, bzw. ihrer Volumen-Äquivalente in µl aufgetragen. Mit den Faktoren aus den zugehörigen Geradengleichungen wurden nun aus den gleichzeitig ermittelten C_T-Werten der Untersuchungs-Proben deren Volumen-Äquivalente berechnet. Der Probe mit dem geringsten Volumen-Äquivalent bei der real-time-PCR des housekeeping-Gens wurde der Faktor 1 zugeordnet. Alle anderen wurden zu diesem ins Verhältnis gesetzt. Die sich daraus ergebenden Faktoren sind ein Maß für die housekeeping-Template-Mengen in jeder Probe. In einem weiteren Berechnungs-Schritt wurden die Faktoren der Proben auf ihre jeweilige Negativ-Kontrolle (= Scheininfektion) bezogen. Auf diese Weise erhielt man relative housekeeping-Template-Konzentrationen der Untersuchungs-Proben im Verhältnis zur Negativ-Kontrolle des jeweiligen Ernte-Zeitpunktes. Die Volumenäquivalente der cox-2-PCR der Untersuchungspoben wurden nun zu den o.g. Faktoren der housekeeping-PCR in Beziehung gesetzt. So wurde die relative Expressions-Stärke bezogen auf das housekeeping-Gen ausgedrückt. Anschließend wurden die relativen Expressionsstärken der cox-2-Gen-Proben bezogen auf die Negativ-Kontrolle des jeweiligen Erntezeitpunktes als Ergebnis dargestellt.

4.8.6 Mycoplasmen-PCR

Die regelmäßige Überprüfung der Zellkulturen auf evtl. vorhandene Mycoplasmenkontaminationen, sowie die Überwachung der Mycoplasmen-Eradikation aus Chlamydien-Präparationen erfolgte mittels einer Breitspektrum-PCR auf Mycoplasmen (WIRTH et al., 1994).

Die verwendeten Primer sind in (3.8.1) gelistet. Die Zielsequenz der Primer liegt in konservierten Sequenzen des 16S-rRNA-Gens. Durch den Einsatz einer Gruppe verschiedener Primer deckt die PCR bei den hier verwendeten Annealing-Temperaturen eine Bandbreite von mindestens 15 Spezies der Familie Mollicutes ab, inclusive der am häufigsten in der Zellkultur auftretenden Arten.
Die Produkte der outer-Reaktion waren 504 – 519 bp, die der nested-Reaktion 318 – 333 bp lang. Der Längenpolymorphismus der PCR-Produkte spiegelt die Sequenzvariationen der verschiedenen Mycoplasmenspezies wieder.
Zur Aufreinigung der DNA aus Zellpellets von ca. 10^6 Zellen oder dem Sediment aus 1 ml Kulturüberstand der Zellen bewährte sich die Benutzung des Qiaex II-Kits der Fa. Qiagen (Hilden). Dabei wurden 100 µl DNA-Eluat erhalten, von dem 5 µl in die outer-Reaktion eingesetzt wurden. Der Reaktionsmix der outer-Reaktion (50 µl) setzt sich wie folgt zusammen:

1 x Taq-Puffer (für LD-Taq, Fa. Perkin Elmer)
1,25 mM $MgCl_2$
1 µM outer-Primer-Mix (*)
200 µM je dNTP
1,25 U LD-Taq-Polymerase

(*) Konz.-Angabe bez. auf den Gesamt-Primer-Gehalt, bestehend aus 9 verschiedenen Primern (siehe 3.8.1) jew. In Konz. 0,11 µM darin enthalten.

Es wurde die LD-Taq-Polymerase der Fa. Perkin Elmer verwendet, die durch eine spezielle Aufreinigung einen besonders niedrigen Gehalt an endogener bakterieller DNA aufweist („***l**ow **D**NA*“). Sie sollte zur Amplifikation bakterieller DNA-Sequenzen verwendet werden, da bakterielle DNA in Taq-Präparationen die PCR stören kann, wenn sie ko-amplifiziert wird und so falsch-positive Resultate hervorruft.
Vor der Amplifikation wurden die Proben zur Denaturierung 10 min auf 90°C erhitzt. Die Reaktionsbedingungen über 30 Zyklen lagen bei 30 sec 94°C (Denaturierung), 30 sec 67°C (Primeranlagerung) und 60 sec 72°C (Verlängerung). Anschließend fand eine 10-minütige Primerextension bei 72° statt. 2 µl des outer-PCR-Produktes wurden anschließend noch in einer nested-Reaktion amplifiziert. Abgesehen von der entsprechenden Primer-Mischung war der Reaktionsmix wie der der outer-Reaktion zusammengesetzt. Die Amplifikationsbedingungen unterschieden sich von denen der outer-Reaktion nur hinsichtlich der Primeranlagerung, die hier bei 63°C durchgeführt

wurde. In beiden Reaktionen (outer und nested) wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Je 10 µl der Proben wurden anschließend gelelektrophoretisch analysiert.

4.8.7 Restriktionsverdau mit der Endonuklease HpaI

Falls bei der Mycoplasmen-PCR die untersuchten Proben hohe Konzentrationen chlamydialer DNA enthalten, kann es zur Ko-Amplifikation chlamydialer DNA, im Sinne eines positiven Resultates kommen. Es wurde daher eine einfache Methode zur Differenzierung von chlamydialen und mycoplasmalen Produkten entwickelt (KRAUßE-OPATZ et al., 2000). Ein Verdau der outer- und nested-Produkte mit der Restriktionsendonuklease *Hpa*I ergab bei mycoplasmalen und chlamydialen Amplifikaten jeweils verschiedene Fragmente, die gelelektrophoretisch auf 2,4%igen Agarosegelen mit SYBR-Gold analysiert werden konnten (genauer ausgeführt in 5.1.1).
Dazu wurden 10 µl des PCR-Produktes mit einem Gemisch aus 2µl *Hpa*I-Puffer (NE 4), 6 µl H_2O und 2 µl *Hpa*I (10 U) gemischt und bei 37°C für 2 Std. inkubiert.

4.8.8 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse der PCR- und RT-PCR-Produkte diente die elektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen. In der Regel wurden 1,5 bis 2%ige Agarosegele in TBE-Puffer eingesetzt, denen Ethidiumbromid in deiner Konzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt wurde. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer. Von den PCR-Ansätzen wurden jeweils 10 µl aufgetrennt und dazu mit 4 µl 5x Stoppuffer versetzt. Bei Verwendung der RedTaq-Polymerase, wurde das PCR-Produkt direkt auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei einer Spannung von 120 V für ca. 45 – 60 min statt. Als Längenstandard wurde eine Mischung aus mit *Hpa*II, *Dra*I und *Hind*III verdaute pUCBM21 DNA (Standard V bzw. VIII, Boehringer Mannheim) mitgeführt. Die auf einer UV-Durchlichtapparatur bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbaren DNA-Banden wurden zur Dokumentation mit einer Polaroidkamera photographiert.

4.9 Elektronenmikroskopie

Die in SPG-Lösung eingefrorenen Chlamydien wurden aufgetaut und in 10 mM $CaCl_2$-Lösung aufgenommen. Anschließend wurden 5 µl dieser Lösung mit 5µl 2% BSA und 5 µl 2% Phosphorwolframsäure, pH 7 gemischt. Diese Suspension wurde auf kollodium-beschichtete, karbon-verstärkte grids für die Elekrtronenmikroskopie

aufgetropft. Überflüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig mit einem Stück Filterpapier abgesogen und das so beschickte grid im Luftstrom der Sterilbank getrocknet. Die Präparate wurden unter 100 kV an einem Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10 A) von Herrn Dr. S. Marienfeld in der Abteilung für Tierökologie und Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Teil I: Mycoplasmen-Kontamination von Chlamydien-Stämmen

In der Literatur wurde mehrfach die Kontamination von chlamydialen Stämmen mit verschiedenen Mycoplasmen-Spezies beschrieben. Bis zu 50% der untersuchten Chlamydien-Stämme waren kontaminiert. Die Zahl untersuchter Stämme war jedoch in allen Studien gering. Ziel der hier vorgelegten Untersuchungen war es, eine repräsentative Zahl von *Chlamydia trachomatis*- und *Chlamydophila pneumoniae*-Stämmen aus unterschiedlichen staatlichen, kommerziellen und privaten Quellen auf eventuelle Kontaminationen mit Mycoplasmen zu testen, die biologische Relevanz für Chlamydien-Infektionen zu bestimmen und eine Methode zur selektiven Eradikation von Mycoplasmen aus Chlamydien-Präparationen zu entwickeln.

5.1.1 Mycoplasmen-PCR und Entwicklung einer Methode zur Differenzierung von mycoplasmalen und chlamydialen Amplifikaten

Die Untersuchung aufgereinigter DNA aus Chlamydien-Suspensionen auf mycoplasmale DNA wurde mit einer Mycoplasmen-PCR (4.8.6) durchgeführt, mit deren Hilfe 15 verschiedene Mycoplasmenspezies detektiert werden können. Die Ziel-DNA ist mycoplasmalen 16S-rRNA-Sequenzen analog. Beim Einsatz hochkonzentrierter chlamydialer DNA in die Mycoplasmen-PCR kann eine Ko-Amplifikation chlamydialer DNA nicht ausgeschlossen werden. Es wurde daher eine Methode entwickelt, um eine Differenzierung zwischen chlamydialer und mycoplasmaler DNA zu ermöglichen. Dazu wurden die der 16S rRNA entsprechenden DNA-Sequenzen von Mycoplasmen und Chlamydien (retrieve@ncbi.nlm.nih.gov und http://genome.dkfz-heidelberg.de/biounit/) mit Hilfe des Software-Programms *Gene Runner* auf Schnittstellen von Restriktions-endonukleasen untersucht. Als geeignet stellte sich die Endonuklease *Hpa*I heraus, die mycoplasmale und chlamydiale DNA einmal an jeweils verschiedenen Positionen schneidet (vgl. Abb. 2). Auf diese Weise entstehen je nach Gattung Fragmente verschiedener Längen, die gelelektrophoretisch detektiert und unterschieden werden können (4.8.7) (KRAUßE-OPATZ et al., 2000).

Chlamydiale outer-PCR-Amplifikate werden durch *Hpa*I in ein 287 bp- und ein 234 bp-Fragment gespalten, während mycoplasmale outer-PCR-Amplifikate Längen von 368 - 371 bp und 149 - 152 bp aufweisen. Eine Ausnahme bilden die Spezies *Mycoplasma hominis*, *M. hypopneumoniae*, *M. gallisepticum* und *Acholeplasma laidlawii*, die keine *Hpa*I-Schnittstelle im outer-Produkt besitzen. Die nested-Produkte chlamydialen Ursprungs werden durch *Hpa*I in ein 119 bp und 214 bp-Fragment gespalten, während mycoplasmale nested-Produkte keine *Hpa*I-Schnittstelle enthalten. Die Analyse der Restriktionsfragmente ermöglicht eine Zuordnung zu den Gattungen Chlamydia/Chlamydophila oder Mycoplasma/Acholeplasma.

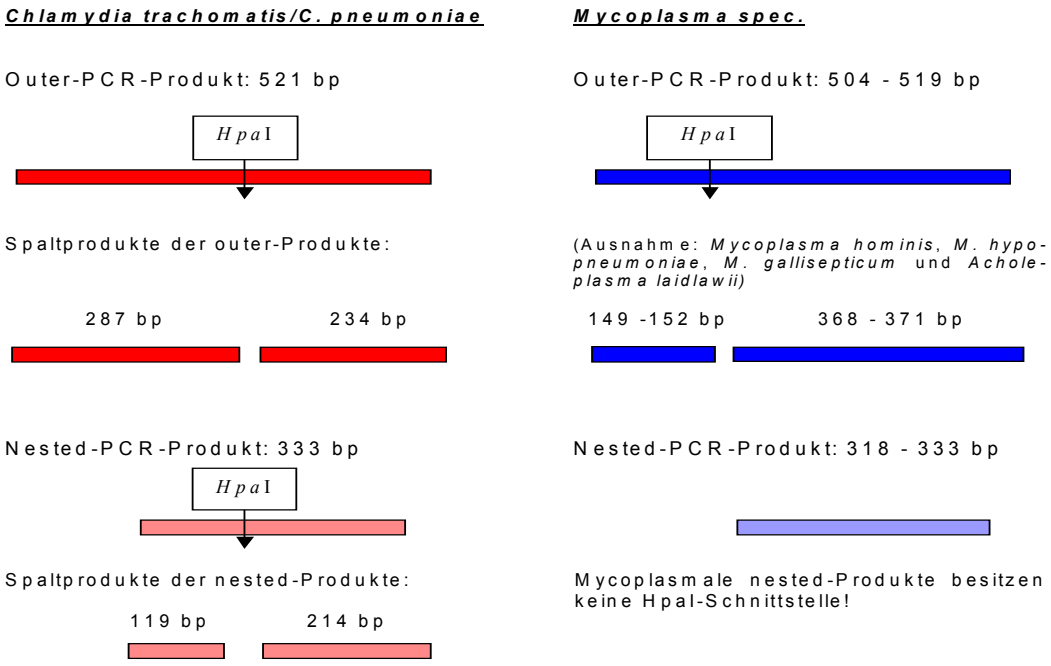

Abb. 2: Differenzierung von outer- und nested-Amplifikaten der Mycoplasmen-PCR mittels *Hpa*I-Verdau.
Je nachdem, ob Mycoplasmen-DNA oder chlamydiale DNA amplifiziert wurde entstehen nach einem Verdau mit der Restriktionsendonuclease *Hpa*I Fragmente verschiedener Längen, die eine Zuordnung zur entsprechenden Gattung erlauben.

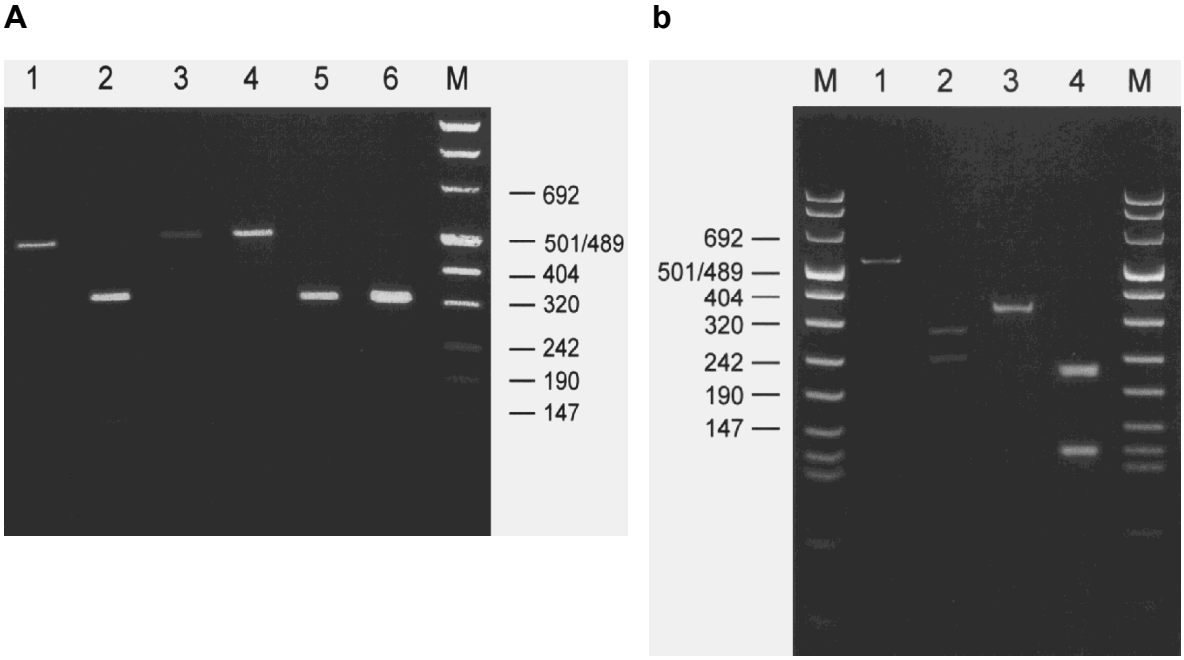

Abb. 3 a, b: *Hpa*I-Verdau von mycoplasmalen (a), und chlamydialen (b) 16S rDNA-PCR-Produkten

a-1: *M. fermentans*-outer-PCR-Produkt, unverdaut (520 bp) und a-2: *Hpa*I-verdaut (368, 152 bp); a-3: *M. hominis*-outer-PCR-Produkt unverdaut (520 bp) und a-4: *Hpa*I-verdaut (keine Schnittstelle); a-5: *M. fermentans* nested-PCR-Produkt unverdaut (332 bp) und a-6: *Hpa*I-verdaut (keine Schnittstelle). b-1: *CP*-outer-PCR-Produkt (521 bp), unverdaut und b-2: *Hpa*I-verdaut (287, 234 bp); b-3: *CP*-nested-PCR-Produkt (333 bp) unverdaut und b-4: *Hpa*I-verdaut (119, 214 bp).

5.1.2 Untersuchung von Chlamydien-Isolaten auf Mycoplasmen

Neun *Chlamydia trachomatis* Serovare, sowie 17 Stämme von *Chlamydophila pneumoniae* wurden auf Kontamination mit Mycoplasmen überprüft. Es handelte sich bei allen Isolaten um Chlamydiensuspensionen mit hohen Elementarkörper-Dichten aus verschiedenen Quellen (3.9.1 und 3.9.2). Alle positiven Resultate wurden durch den *Hpa*I-Verdau verifiziert. Im Folgenden sind Stämme, Bezugsdaten und die Ergebnisse der Mycoplasmen-PCR aufgelistet.

5.1.2.1 *Chlamydia trachomatis*-Stämme

Serovar	Bezeichnung	Bezugsdatum	Ergebnis
A	G-17/OT H_{17}	1997	positiv
Ba	VR347	1986	positiv
D	UW-3/CX H_{20}	1997	positiv
F	VR 346	1986	mycoplasmenfrei
G	VR 878	1986	mycoplasmenfrei
I	VR 880	1986	mycoplasmenfrei
K	UW-31/CX H_{39}	1997	positiv
K	UW-31/CX	1989	positiv
LGV 1	VR 901B	1986	mycoplasmenfrei

5.1.2.2 *Chlamydophila pneumoniae*-Stämme

Nr.	Bezeichnung	Bezugsdatum	Ergebnis
1	VR 1310	1998	mycoplasmenfrei
2	VR 2282	1998	positiv
3	VR 53 592	1998	mycoplasmenfrei
4	CM-1	1999	mycoplasmenfrei
5	CWL-011	1999	mycoplasmenfrei
6	CWL-029	1999	mycoplasmenfrei
7	CWL-050	1999	mycoplasmenfrei
8	FML-16	1999	mycoplasmenfrei
9	7N	1999	mycoplasmenfrei
10	10N	1999	mycoplasmenfrei
11	12N	1999	mycoplasmenfrei
12	16N	1999	positiv
13	19N	1999	positiv
14	T 2043	1999	positiv
15	T 2023	1999	positiv
16	TW 183	1999	mycoplasmenfrei
17	Isolat: Patient MHH (Pneumonie + reA)	1998	positiv

Fünf der positiv getesteten Spezies, *Chlamydia trachomatis*, Serovar A (G-17/OT H_{17}), D (UW-3/CX H_{20}), K (UW-31/CX H_{39}) und K (UW-1/CX) und das klinische Isolat von *Chlamydophila pneumoniae* wurden hinsichtlich der kontaminierenden Spezies genauer untersucht. Dazu wurden die Outer-PCR-Produkte dieser fünf Spezies sequenziert (Fa. MWG) und mit den Genbank-Sequenzen verglichen.
Die PCR-Produkte der Serovare A, D und K von der WRF zeigten 100% Sequenzhomologie mit der Sequenz des 16S rRNA, rrnB operons von *Mycoplasma hominis* (EMBL accession no. AJ002265 und AJ002267-69). Das PCR-Produkt von *C. trachomatis* Ser. K (UW-1/CX) war zu 100% homolog zur *M. fermentans* 16S rRNA-Sequenz (GenBank accesion no. M24289). Das PCR-Produkt des klinischen *C. pneumoniae*-Isolates zeigte 100% Sequenzhomologie zur *M. hyorhinis* 16 S rRNA-Sequenz (accesion no. M24658).

Eine elektronenmikroskopische Untersuchung einer hochkonzentrierten *Chlamydia trachomatis*-Suspension (Serovar K; UW-31/CX, 1989) zeigte die gleichzeitige Anwesenheit zweier verschiedener Bakterienarten in dieser Suspension, kleinere kugelförmige Chlamydien neben stäbchenförmigen Mycoplasmen mit variabler Länge und einen teilweise fädigen Erscheinungsbild (Abb. 4 a, b).

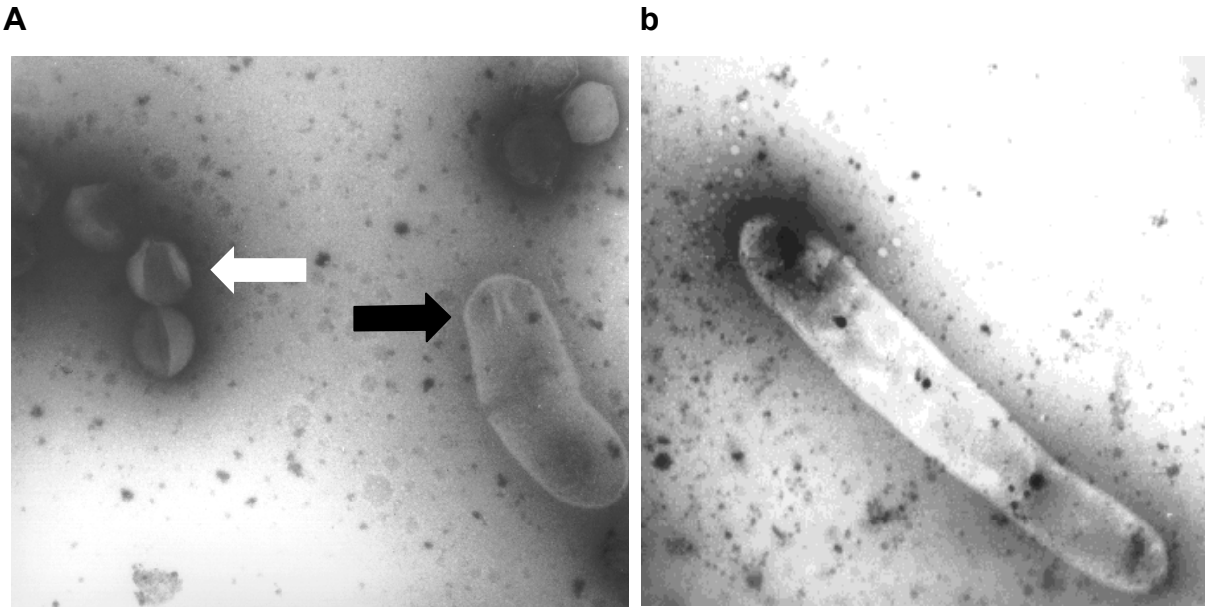

Abb. 4 a, b: ***C. trachomatis,*** **Ser. K (UW-31/CX) Elementarkörperchen und** ***M. fermentans*****-Kontamination.**
a: *CT*-Elementarkörper (weißer Pfeil) und mycoplasmale Zelle (schwarzer Pfeil); 22.000-fach vergrößert. b: Fädiges Erscheinungsbild einer *M. fermentans*-Zelle aus der gleichen *CT*-Präparation.

5.1.3 Untersuchung des Einflusses von Mycoplasmen auf die Entwicklung von Chlamydophila pneumoniae

Es ist nicht bekannt, ob Mycoplasmen die chlamydiale Infektion in HEp-2-Zellen modifizieren können. Um den Einfluss von Mycoplasmen auf *Chlamydophila pneumoniae*-Infektionen zu untersuchen, wurden Kulturen von *C. pneumoniae* allein und bei gleichzeitiger Anwesenheit verschiedener CFU von *Mycoplasma hyorhinis* oder *M. fermentans* untersucht.

Dazu wurden HEp-2-Zellen mit *Chlamydophila pneumoniae* infiziert. Zu jeder *CP*-Infektion wurden verschiedene CFU an *Mycoplasma fermentans* oder *M. hyorhinis* gegeben. Als Kontrollen dienten nur mit den entsprechenden CFU an *M. fermentans* oder *M. hyorhinis* infizierte und nur mit *CP* infizierte HEp-2-Zellen. Vier und sieben Tage nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und mit dem direkten immunfluoreszenzmikroskopischen Test für *CP* gefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der Einschlusskörperchen.

Die mycoplasmalen CFU, die bei der Infektion zu den Zellen gegeben wurden, sind nicht als statische Größen zu betrachten. Da die Mycoplasmen vital und vermehrungsfähig waren, stieg ihre Anzahl innerhalb der nächsten Tage an. Dies wurde protokolliert, indem Proben des Kulturüberstandes zur Bestimmung der mycoplasmalen CFU verwendet wurden. Das Wachstum von *M. fermentans* und *M.*

hyorhinis ist in Abb. 5 gezeigt. Bemerkenswert ist der Anstieg der Mycoplasmendichte z. T. um mehrere log-Stufen. Demgegenüber blieb die Zahl der HEp-2-Zellen im Laufe des Versuches konstant. Das initiale Zell : Mycoplasmen-Verhältnis verschob sich im Laufe des Versuches daher zugunsten der Mycoplasmen.

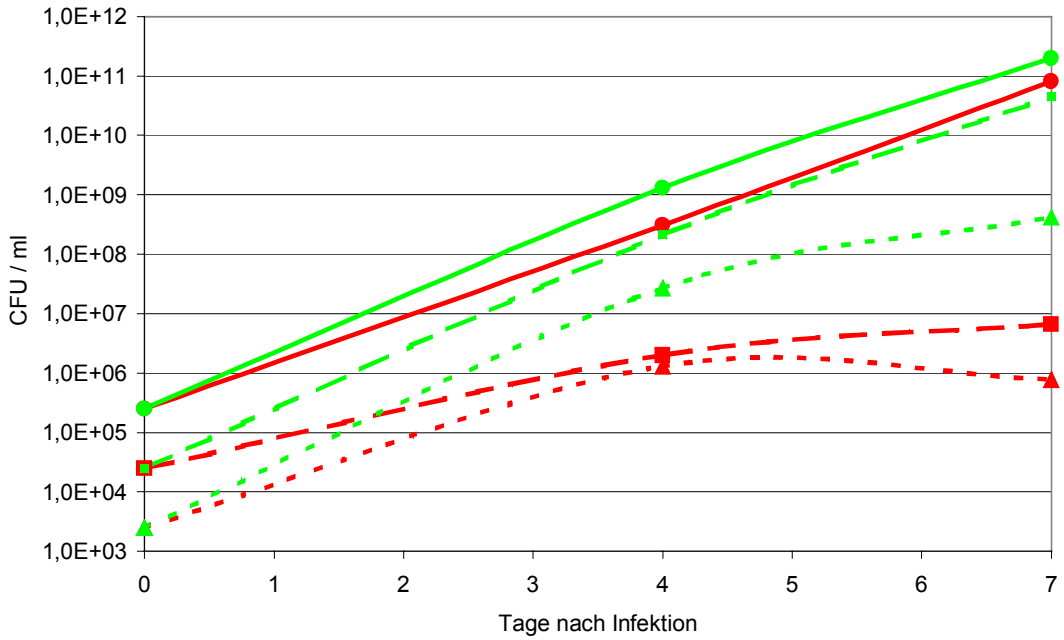

Abb. 5: Wachstumskontrolle der zur Infektion zugesetzten Mycoplasmen.
Bestimmung der mycoplasmalen CFU in den Kulturüberständen. Rote Linien: *M. fermentans*; grüne Linien: *M. hyorhinis*. Die CFU am Tag der Infektion sind durch verschiedene Schraffuren dargestellt. Duchgezogene Linien: CFU 2,5 x 10^5; gestrichelte Linien: 2,5 x 10^4; gepunktete Linien: 2,5 x 10^3 (1 Experiment).

Beide Mycoplasmen-Spezies reduzierten signifikant die Entwicklung von chlamydialen Einschlusskörperchen: Bei einer chlamydialen MOI von 0,005 reduzierten Mycoplasmen (CFU = 2,5 x 10^3/ml), entsprechend einem Chlamydien : Mycoplasmen-Verhältnis von 10 : 1 zu Beginn der Infektion, die Zahl der sich entwickelnden Einschlußkörper um 45 % (*M. fermentans*) und 41 % (*M. hyorhinis*). Ein höheres Chlamydien : Mycoplasmen-Verhältnis von 1 : 1 (CFU = 2,5 x 10^4) führte zu einer Abnahme der Einschlusskörper-Anzahl um 87% (*M. fermentans*) oder 54 % (*M. hyorhinis*). Bei einem initialen Chlamydien : Mycoplasmen-Verhältnis von 1 : 10 (CFU = 2,5 x 10^5) war die Einschlusskörper-Entwicklung bei beiden Mycoplasmen-Arten vollständig supprimiert ($p < 0,05$ für *M. hyorhinis* bei der geringsten CFU und $p < 0,001$ für alle anderen Proben).

Der anti-chlamydiale Effekt von Mycoplasmen konnte in gleicher Weise auch bei beiden anderen untersuchten chlamydialen MOI (0,05 und 0,0005) und nach der Ernte 7 Tage nach der Infektion (nach zwei Replikationszyklen) beobachtet werden.

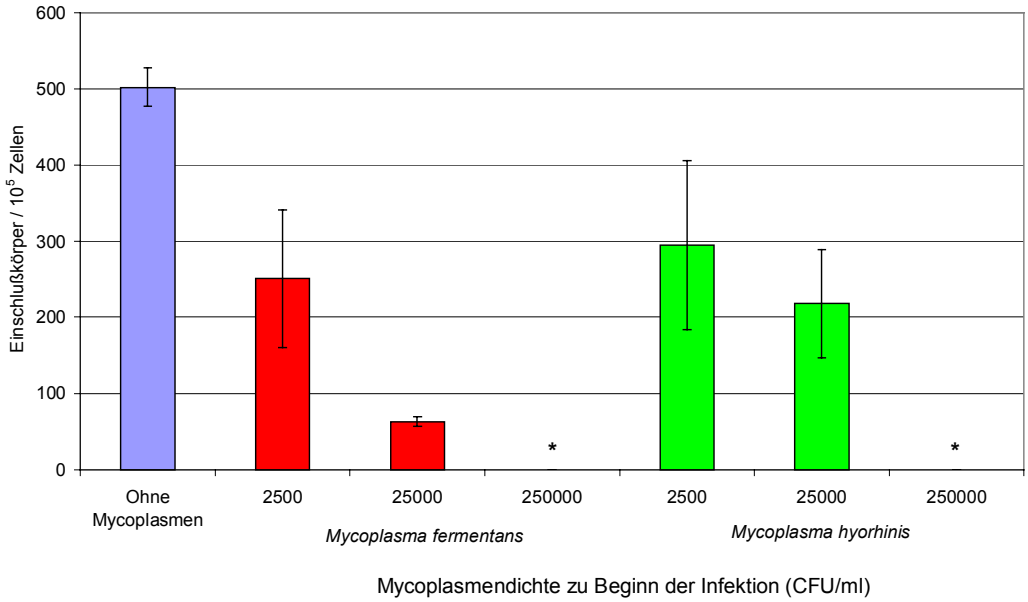

Abb. 6: Einfluss von Mycoplasmen auf die Entwicklung chlamydialer Einschlusskörperchen. HEp-2-Zellen infiziert mit *Chlamydophila pneumoniae* (MOI 0,005) ohne oder mit *M. fermentans* oder *M. hyorhinis* bei verschiedenen CFU/ml 4d p.i.. FITC-gefärbte Einschlusskörper pro 10^5 Zellen in Abhängigkeit von der initialen Mycoplasmendichte. Bei einer Mycoplasmendichte von 2,5 x 10^5 CFU/ml wurden keine Einschlußkörper mehr beobachtet (*). Zwei unabhängige Experimente wurden jeweils in Doppelansätzen durchgeführt. Die Standardabweichung ist durch die Fehlerindikatoren gezeigt.

Die Einschlusskörper veränderten sich mit zunehmender Mycoplasmendichte im Medium auch hinsichtlich ihrer Größe. Wurden sie mit Hilfe eines Objektmikrometers in zwei Kategorien (>10 µm/<10 µm) aufgeteilt, so ergab sich eine Größenabnahme, wie in Abb. 8 dargestellt. Bei einer initialen CFU von 2,5 x 10^4 waren die Einschlusskörper zum großen Teil nicht nur kleiner als 10 µm, sondern diese auch

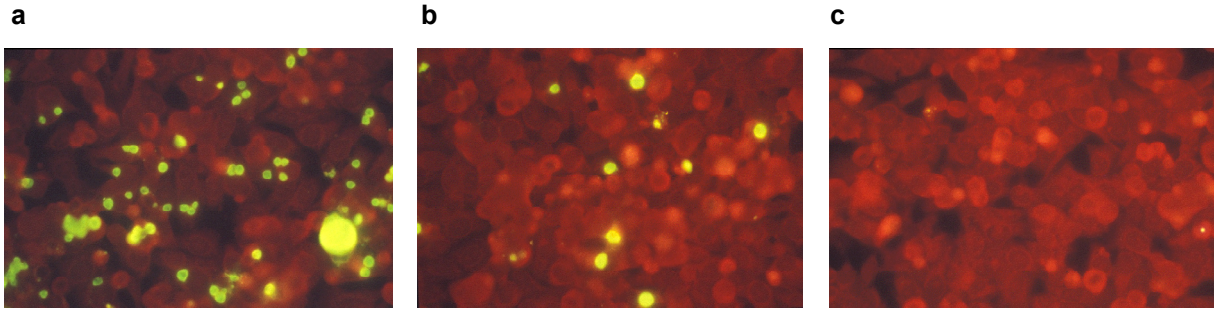

Abb. 7a, b, c: Einfluss von *M. hyorhinis* auf die Entwicklung von *CP* in HEp-2-Zellen. *CP*-infizierte HEp-2-Zellen (MOI 0,05), ko-kultiviert mit *M. hyorhinis* bei verschiedenen CFU (a: 2,5 x 10^3, b: 2,5 x 10^4, c: 2,5 x 10^5 CFU/ml). Die Zellen wurden 4d p.i. mit dem direkten IF-Test für *CP* gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch visualisiert.

untypisch angefärbt. Fluoreszenzmikroskopisch erschienen sie als dunkle Körper mit einem apfelgrün leuchtenden Randbereich, im Gegensatz zu „normalen“ homogen fluoreszierenden Einschlusskörpern.

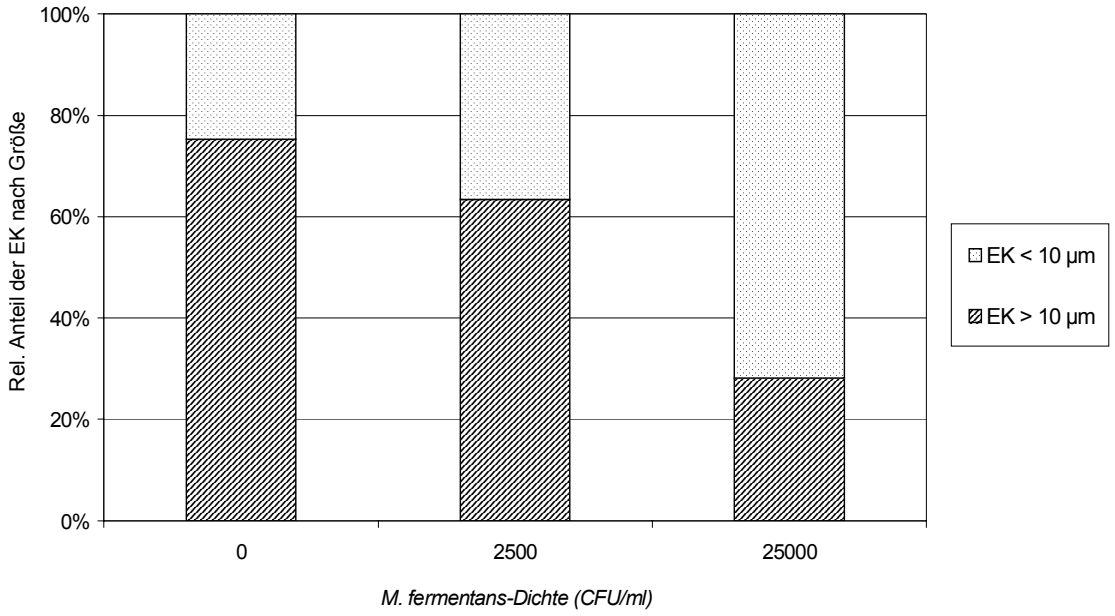

Abb. 8: Relative Größenverteilung der chlamydialen Einschlußkörper
FITC gefärbte *CP*-EK (+/- *M. fermentans*) in HEp-2-Zellen (MOI 0,005/4d p.i.) wurden in die Größenkategorien < 10 µm und > 10 µm kategorisiert. Bezogen auf die Gesamt-Zahl der jeweils vorhandenen EK ergab sich eine Abnahme der größeren und eine Zunahme der kleineren Einschlüsse bei zunehmender Mycoplasmendichte (1 repräsentatives von 2 Experimenten).

5.1.4 Entwicklung einer Methode zur Eliminierung von Mycoplasmen aus kontaminierten Chlamydien-Suspensionen

Ein klinisches Isolat von *Chlamydophila pneumoniae*, kontaminiert mit *M. hyorhinis* wurde einer eigens entwickelten Behandlung mit dem Antibiotikum Mupirocin unterzogen. Die Therapie wurde während des Wachstums der Chlamydien in HEp-2-Zellen durchgeführt. Mupirocin, ein Antibiotikum aus *Pseudomonas fluorescens* (WARD & CAMPOLI-RICHARDS, 1986) wurde in den Konzentrationen 10 µg/ml und 5 µg/ml angewendet (KRAUßE-OPATZ et al., 2000). Da die Aktivität von Mupirocin in Anwesenheit von Serum erniedrigt ist, wurde in diesen Versuchen mit FCS-freiem Kulturmedium gearbeitet. *CP* -infizierte HEp-2-Monolayer wurden 3-4 Tage lang mit den angegebenen Konzentrationen von Mupirocin behandelt. Danach erfolgten mehrere Passagen der behandelten Chlamydienkulturen auf frische Zellen, wie in (4.4) beschrieben. Bei jeder Ernte wurde 1 ml der Zellsuspension mittels PCR auf Mycoplasmen untersucht. Ein weiterer Milliliter der Zellsuspension wurde auf HEp-2-

Zellen gegeben und eine Woche lang mit Kulturmedium ohne Antibiotika kultiviert, um eventuell in der Kultur überlebenden Mycoplasmen die Möglichkeit zu geben, sich zu vermehren.

Eine 15-tägige Behandlung mit 10 µg/ml Mupirocin (3 Passagen) war zur Elimination von *M. hyorhinis* aus dem klinischen Isolat von *CP* ausreichend. Dieses Ergebnis wurde durch Untersuchung von Proben nach Weiterkultur in antibiotikafreiem Medium bestätigt.

Aus der gereinigten Chlamydien-Kultur wurden anschließend hochkonzentrierte Chlamydiensuspensionen präpariert. Die Reinheit dieser Präparationen wurde nochmals mit der Mycoplasmen-PCR und anschließendem *Hpa*I-Verdau kontrolliert und bestätigt.

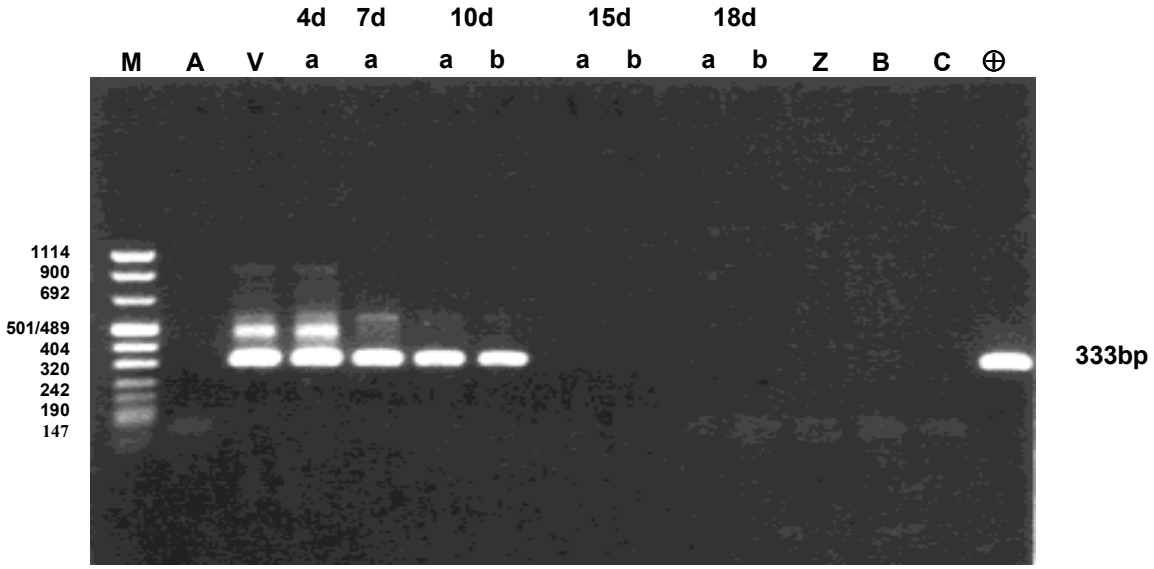

Abb. 9: Verlauf der Dekontamination eines *M. hyorhinis*-infizierten *CP*-Isolates.
Die DNA-Extrakte wurden mit der Mycoplasmen-PCR untersucht. Die mycoplasmenspezifische 333 bp-Bande der nested-Reaktion war nach 15 Tagen Mupirocin-Behandlung verschwunden. M: Marker; A: Negativ-Kontrolle der nested-PCR; B: H_2O-Kontrolle; C: Negativ-Kontrolle der DNA-Extraktion; V: Probe vor Behandlungsbeginn; Z: HEp-2-Zellen ⊕: Positiv-Kontrolle; a: Probe aus dem Kultur-Überstand; b: Zell-Probe; d: Tage nach Behandlungsbeginn

5.2 Teil II: Chlamydiale Persistenz in monozytären und epithelialen Zellen

5.2.1 Einfluss von IFNγ auf CT-Infektionen in THP-1- und HEp-2-Zellen

Die monozytäre Vorläufer-Zelllinie THP-1 wurde als Modellsystem zur Untersuchung der IFNγ-induzierten chlamydialen Persistenz in Monozyten ausgewählt, während HEp-2-Zellen als epitheliale Modellzelle dienten. Der Einfluss von IFNγ auf die Entwicklung der chlamydialen Einschlußkörper wurde in THP-1- und HEp-2-Zellen untersucht. Das Anzeigesystem dieser Versuche war die Einschlusskörper-Anzahl pro Vertiefung einer 96-well-Platte. Die IFNγ-Wirkung wurde an der Reduktion der Einschlusskörper-Anzahl pro well bemessen.

Voruntersuchungen zur Etablierung der Experimente beinhalteten die Testung verschiedener FCS-Konzentrationen sowie verschieden lange Vorinkubations-Zeiten und IFNγ-Konzentrationen bei der Behandlung der Zellen:

In einer Versuchsreihe wurden THP-1-Zellen in Medien mit verschiedenen FCS-Konzentrationen (1, 5 und 10%) kultiviert und jeweils 1, 2 und 3 Tage lang mit verschiedenen IFNγ-Konzentrationen vorinkubiert (Abb. 10).

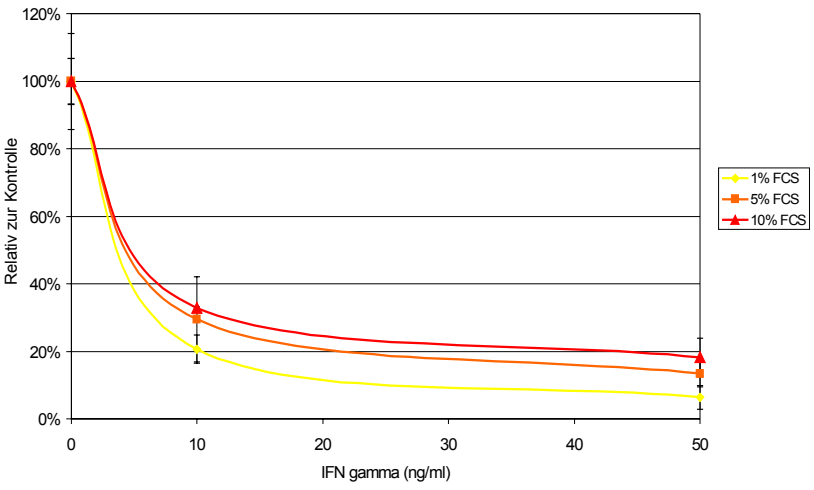

Abb. 10: Einfluss der FCS-Konzentration auf die IFNγ-bedingte Suppression der EK-Anzahl.
THP-1-Zellen wurden 2 Tage lang mit IFNγ und verschiedenen FCS-Konzentrationen vorinkubiert. Danach wurde mit *CT* (MOI 0,002) infiziert und 2 Tage lang mit den entsprechenden Medien weiter inkubiert. Die IFNγ-abhängige Suppression der EK-Entwicklung wurde relativ zur Kontrolle dargestellt (Mittelwerte von 3-fach-Ansätzen +/- SD; 1 Experiment).

Die Versuche ergaben eine stärkere Hemmung der EK-Entwicklung, je weniger FCS im Medium vorhanden war. Allerdings waren die gebildeten Einschlüsse bei der geringsten FCS-Konzentration von 1% sehr klein und schwach angefärbt. Mit zunehmender FCS-Konzentration wurden sie größer und kräftiger gefärbt. Als optimal hinsichtlich der Größe und Anfärbbarkeit der Einschlüsse einerseits und der Wirksamkeit von IFNγ andererseits hat sich eine Konzentration von 5% FCS im Medium herausgestellt.

Auch mit zunehmender Vorinkubationszeit stieg die IFNγ-bedingte Hemmung der EK-Entwicklung an. Als optimal hat sich hier eine zwei- bis dreitägige Vorinkubation der Zellen mit IFNγ ergeben (Abb. 11).

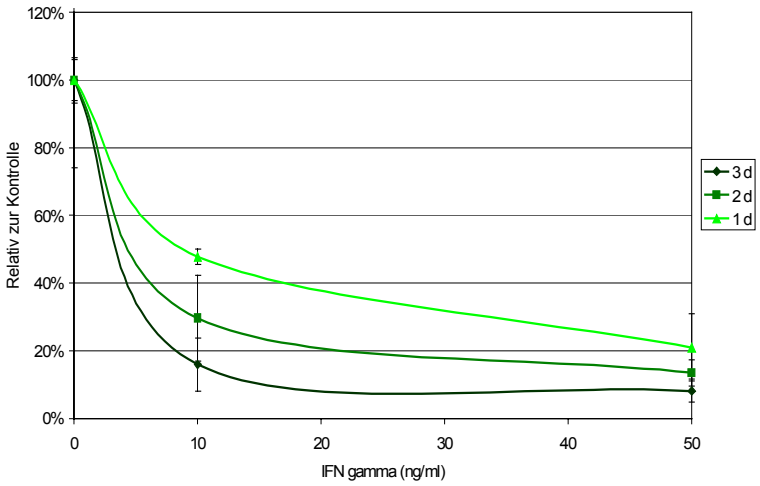

Abb. 11: Einfluss der Dauer der Vorinkubation auf die IFNγ-bedingte Suppression der EK-Anzahl.
THP-1-Zellen wurden in Medium/5% FCS und IFNγ verschieden lange vorinkubiert. Danach wurde mit *CT* (MOI 0,002) infiziert und 2 Tage lang mit den entsprechenden Medien weiter inkubiert. Die IFNγ-abhängige Suppression der EK-Entwicklung wurde relativ zur Kontrolle dargestellt (Mittelwerte von 3-fach-Ansätzen +/- SD; 1 Experiment).

Ein weiterer Versuch wurde zur Ermittlung der optimalen Wirkkonzentration von IFNγ durchgeführt. Dazu wurden THP-1-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von IFNγ (0 / 1 / 2,5 / 5 / 7,5 / 10 / 25 / 50 ng/ml) drei Tage lang vorinkubiert. Nach Infektion der Zellen mit *C. trachomatis* (MOI 0,002) ergab sich eine relative Suppression der EK-Entwicklung, wie in Abb. 12 dargestellt.

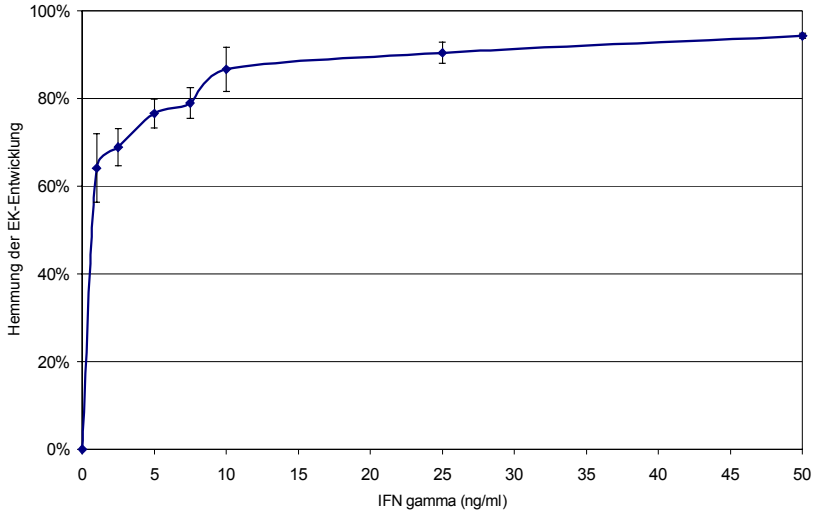

Abb. 12: IFNγ-abhängige Suppression der chlamydialen EK-Entwicklung.
THP-1-Zellen wurden 3 Tage lang mit verschiedenen IFNγ-Konzentrationen in Medium/5% FCS vorinkubiert. Danach wurde mit *CT* (MOI 0,002) infiziert und 2 Tage lang mit IFNγ-haltigem Medium weiter inkubiert. Die IFNγ-abhängige Suppression der EK-Entwicklung wurde relativ zur Kontrolle dargestellt (Mittelwerte von 3-fach-Ansätzen +/- SD; 1 Experiment).

Ein steiler Anstieg der IFNγ-Wirkung, gemessen an der Suppression der EK-Entwicklung zeigte sich im Bereich zwischen 0 und 5 ng/ml IFNγ. Ab 10 ng/ml IFNγ

kam es nur noch zu geringen Zunahmen der IFNγ-bedingten EK-Suppression mit zunehmender IFNγ-Konzentration. Die halbmaximale Wirkkonzentration von IFNγ lag in diesem Versuch noch unter 1 ng/ml. Eine dreitägige Vorinkubation mit 5ng/ml IFNγ führte zu einer fast 80%igen Hemmwirkung. Eine 100%ige Hemmung war mit den verwendeten Konzentrationen an IFNγ nicht möglich. Die Kurve zeigte bei IFNγ-Konzentrationen >10 ng/ml ein Plateau.

Entsprechend diesen Ergebnissen wurden dichte Zellrasen TPA-differenzierter THP-1-Zellen 3 Tage lang mit 5 und 50 ng/ml IFNγ in Medium/5% FCS behandelt und anschließend mit *Chlamydia trachomatis* (MOI 0,004) infiziert. Während der 2 Tage bis zur Reifung der EK wurden die initialen IFNγ-Konzentrationen im Medium beibehalten. Nach der Visualisierung der Einschlusskörper mittels IPA erfolgte die Auswertung von Anzahl und Größe der EK.
Es ergab sich eine Hemmung der Anzahl sich entwickelnder Einschlusskörper in Abhängigkeit von der eingesetzten IFNγ-Konzentration.
Abb. 13 a zeigt das typische Aussehen von *CT*-Einschlusskörperchen in THP-1-Zellen. Sie stellen sich nach Anfärbung mittels IPA als grau-blaue inhomogene, häufig zentral „leer“ erscheinende Partikel in verschiedenen Größen dar. Nach der Behandlung mit 5 ng/ml IFNγ (Abb. 13 b) veränderte sich das Aussehen der Einschlüsse nicht. Bei einer Behandlung mit 50 ng/ml IFNγ fanden sich jedoch nur noch relativ kleine EK mit homogener Anfärbung.

Ohne IFNγ **5 ng/ml IFNγ** **50 ng/ml IFNγ**

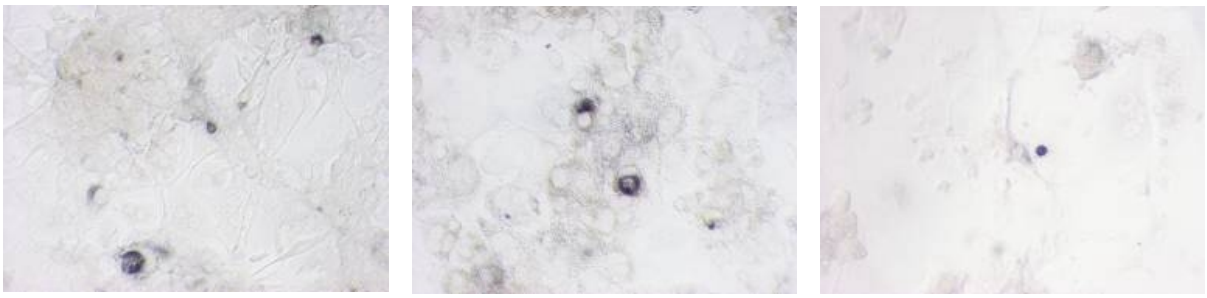

Abb. 13: Einfluss von IFNγ auf die chlamydiale EK-Entwicklung in THP-1-Zellen.
THP-1-Zellen (3 Tage +/- IFNγ vorinkubiert) wurden mit *CT* (MOI 0,004) infiziert und zwei Tage lang mit den angegebenen IFNγ-Konzentrationen inkubiert. Die entwickelten EK wurden mittels IPA gefärbt (1/10 Experimenten).

Eine Auszählung der Einschlusskörper pro well ergab eine deutliche Reduktion der EK-Anzahl in Abhängigkeit von der eingesetzten IFNγ-Konzentration. Beim Einsatz von 5 ng/ml IFNγ reduzierte sich die EK-Anzahl um ca. 50% (SD=16%; n = 10). Wurden die Zellen mit 50 ng/ml IFNγ vorinkubiert, so betrug der inhibierende Effekt 75% (SD=13%; n = 10). Die Ergebnisse von 10 voneinander unabhängigen Experimenten sind in Abb. 14 dargestellt.

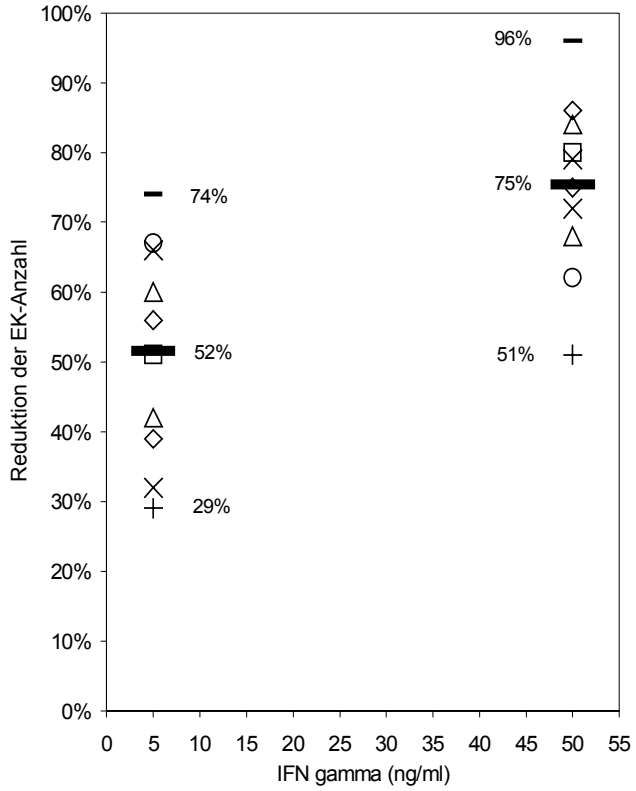

Abb. 14: IFNγ-abhängige Reduktion der Anzahl chlamydialer EK in THP-1-Zellen.
Drei Tage +/-IFNγ vorinkubierte *CT*–infizierte (MOI 0,004) THP-1-Zellen wurden zwei Tage lang mit den angegebenen IFNγ-Konzentrationen weiter inkubiert. Danach wurden die EK/well gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-fach-Ansätzen (10 Experimente). Fett gedruckte Linien geben den Mittelwert aus 10 Experimenten an.

Die entsprechenden Versuche mit HEp-2-Zellen erforderten einige Modifikationen. Da HEp-2-Zellen nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers nicht, wie TPA-behandelte THP-1-Zellen ihr Wachstum einstellen, wurden sie nach der Infektion mit Cycloheximid-haltigem Medium mit den entsprechenden IFNγ-Konzentrationen behandelt. So wurde in diesem Stadium ein Wachstumsstopp der Zellen induziert, der ein Überwachsen des Monolayers verhinderte und die Auswertung der Experimente erleichterte.

HEp-2-Zellen sind leichter infizierbar, als THP-1-Zellen. Infizierte man beide Zelltypen mit der gleichen MOI, so entwickelten sich in HEp-2-Zellen innerhalb der folgenden zwei Tage 12 x mehr Einschlusskörper, als in THP-1-Zellen. Entsprechend musste eine Anpassung der verwendeten MOI erfolgen: HEp-2-Zellen wurden mit der MOI 0,001 infiziert.

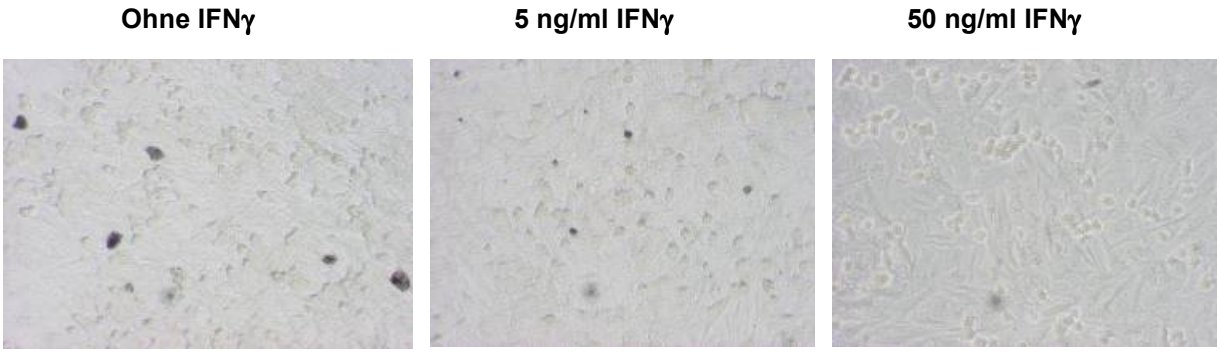

Abb. 15: Einfluss von IFNγ auf die chlamydiale EK-Entwicklung in HEp-2-Zellen.
HEp-2-Zellen (3 Tage mit und ohne IFNγ vorinkubiert) wurden mit *CT* in der MOI 0,001 infiziert und weitere zwei Tage lang mit den angegebenen IFNγ-Konzentrationen inkubiert. 2d p.i. wurden die entwickelten EK mittels IPA visualisiert (1/10 Experimenten).

In HEp-2-Zellen, die in Normalmedium ohne IFNγ 3 Tage lang vorinkubiert wurden, entwickelten sich große chlamydiale Einschlusskörperchen. Sie wurden mittels Immunoperoxydase-Assay als kräftig grau-blau gefärbte EK mit homogener Struktur visualisiert. Die IFNγ-Vorbehandlung resultierte in einer Reduktion der EK-Größe und einer verminderten Intensität der Färbung (vgl. Abb. 15). Die Auszählung der Einschlusskörper pro well ergab zudem eine Reduktion der EK-Anzahl in Abhängigkeit von der eingesetzten IFNγ-Konzentration. Eine dreitägige Vorbehandlung mit 5 ng/ml IFNγ reduzierte die EK-Anzahl im Mittel um 36% (SD=16%; n = 10) und beim Einsatz von 50 ng/ml IFNγ um 71% (SD=21%; n = 10).In Abb. 16 sind die Ergebnisse von 10 unabhängigen Experimenten dargestellt.

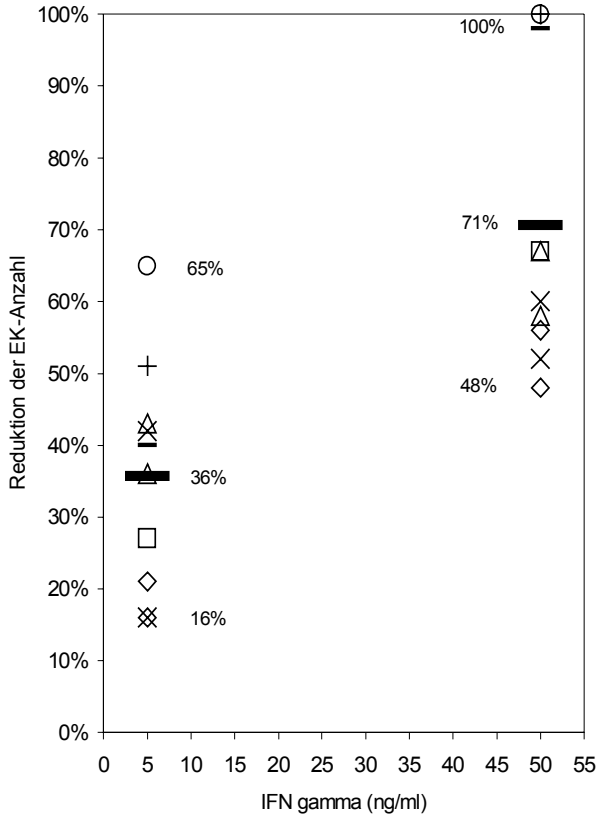

Abb. 16: IFNγ-abhängige Reduktion der Anzahl chlamydialer EK in HEp-2-Zellen.
CT-infizierte HEp-2-Zellen (Vorinkubation 3 Tage +/- IFNγ; MOI 0,001) wurden weitere zwei Tage lang mit den angegebenen IFNγ-Konzentrationen inkubiert. Danach wurden die EK/well gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-fach-Ansätzen von 10 unabhängigen Experimenten. Fett gedruckte Linien geben den Mittelwert aus 10 Experimenten an.

5.2.2 Einfluss von Fe^{2+}-Ionen auf die IFNγ-bedingte Hemmung der EK-Entwicklung in THP-1- und HEp-2-Zellen

Das in (5.2.1) beschriebene Zellkultur-System ist geeignet, die IFNγ-bedingte Reduktion der EK-Anzahl in THP-1- und HEp-2-Zellen quantitativ zu beschreiben. Ziel der weiteren Untersuchungen war, eventuell modulierende Faktoren der IFNγ-induzierten Suppression der EK-Entwicklung zu finden. Ein in diesem Zusammenhang diskutierter Faktor ist der Eisenstoffwechsel der Zellen.

Daher wurde die Abhängigkeit der IFNγ-bedingten Hemmung der EK-Entwicklung von der Konzentration zweiwertiger Eisen-Ionen im Medium sowohl in HEp-2-, als auch in THP-1-Zellen untersucht. Einerseits wurde die Auswirkung der Erhöhung der Konzentration freier Fe^{2+}-Ionen im Medium und andererseits deren Entzug durch den Chelatbildner Deferoxamin (DFO) geprüft.

Für diese Experimente wurden zweiwertige Eisen-Ionen in Form von Eisensulfat ($FeSO_4$) zusammen mit IFNγ während der dreitägigen Vorinkubationsphase ins Medium gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit *C. trachomatis* infiziert und zwei Tage lang mit den jeweiligen Konzentrationen an Eisensulfat und IFNγ weiterbehandelt. Die Auswirkungen der veränderten Medienzusammensetzung auf die Einschlusskörper-Entwicklung in THP-1- und HEp-2-Zellen sind in Abb. 17 und 18 dargestellt.

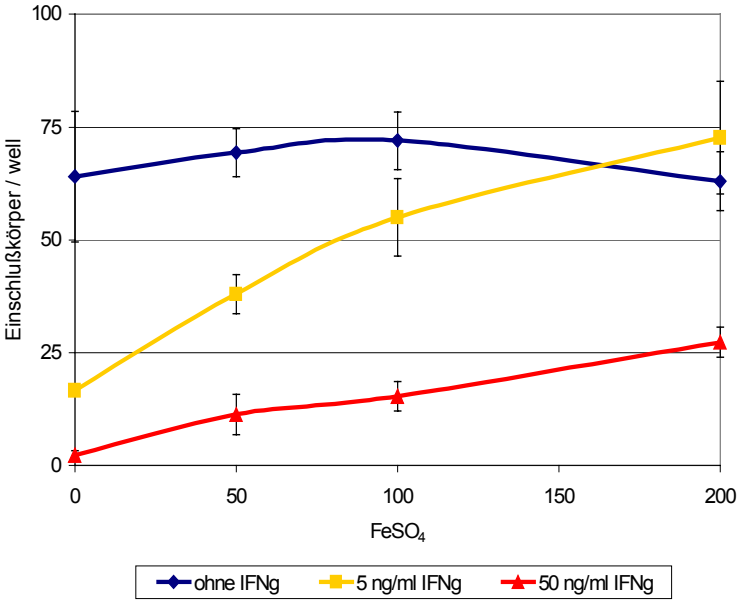

Abb. 17: Auswirkung freier Fe^{2+}-Ionen auf die IFNγ-bedingte Entwicklungshemmung chlamydialer EK in THP-1-Zellen.
Die Zellen wurden 3-Tage (+/- IFNγ / $FeSO_4$) vorinkubiert, *CT*-infiziert (MOI 0,004) und weitere zwei Tage IFNγ- und $FeSO_4$- behandelt. Dargestellt sind die EK/well 2d p.i. als Mittelwerte von 3-fach-Ansätzen +/-SD (1 repräsentatives von 3 Experimenten dargestellt).

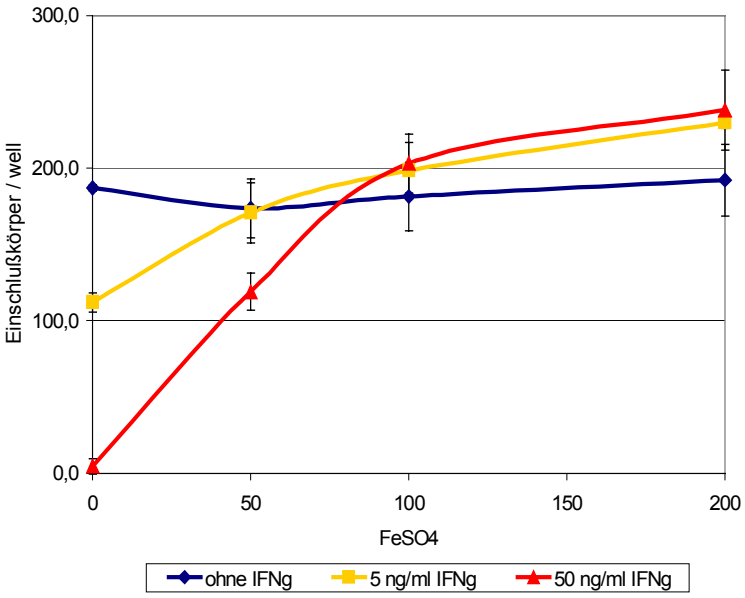

Abb. 18: Auswirkung freier Fe^{2+}-Ionen auf die IFNγ-bedingte Entwicklungshemmung chlamydialer EK in HEp-2-Zellen.
Die Zellen wurden 3-Tage (+/- IFNγ / $FeSO_4$) vorinkubiert, *CT*-infiziert (MOI 0,001) und weitere zwei Tage IFNγ- und $FeSO_4$- behandelt. Dargestellt sind die EK/well 2d p.i. als Mittelwerte von 3-fach-Ansätzen +/-SD (1 repräsentatives von 3 Experimenten dargestellt).

Wie in den in (5.2.1) beschriebenen Experimenten inhibierte IFNγ in beiden Zelllinien dosisabhängig die Zahl der EK. Bei nicht IFNγ-behandelten THP-1- und HEp-2-Zellen blieb die Zahl der EK/well auch nach Erhöhung der Fe^{2+}-Ionen-Konzentration konstant (blaue Linien). Die durch Behandlung mit 5 ng/ml IFNγ induzierte Suppression der EK-Entwicklung wurde in beiden Zelllinien durch den Zusatz freier Fe^{2+}-Ionen aufgehoben (gelbe Linien). Bei THP-1-Zellen wurde eine Kompensation des IFNγ-Effektes durch Zusatz von 150 µM $FeSO_4$ und bei HEp-2-Zellen durch Zusatz von 50 µM $FeSO_4$ erreicht. Bei einer weiteren Erhöhung der Fe^{2+}-Ionen-Konzentration erhöhten sich die EK-Zahlen pro well sogar etwas gegenüber den IFNγ-unbehandelten Zellen. Bei THP-1-Zellen, die mit 50 ng/ml IFNγ behandelt wurden, wurde die IFNγ-induzierte EK-Suppression nur zum Teil aufgehoben. Bei Zusatz von 200 µM $FeSO_4$ erreichte die EK-Zahl pro well nur etwas mehr als 1/3 der Kontrolle ohne IFNγ. In HEp-2-Zellen war auch bei dieser hohen IFNγ-Konzentration eine vollständige Kompensation durch freie Fe^{2+}-Ionen möglich (rote Linien). Durch Vorinkubation mit 100 µM $FeSO_4$ war die IFNγ-bedingte Suppression der EK-Entwicklung nicht nur aufgehoben. Es wurden sogar etwas höhere EK-Zahlen pro well erreicht, als bei der Kontrolle ohne IFNγ.

Eine Erhöhung der Fe^{2+}-Ionen-Konzentration über 200 µM führte nicht zu einem weiteren Anstieg der EK-Anzahl, sondern hatte allgemein einen hemmenden Effekt auf die EK-Entwicklung zur Folge.

In weiteren Versuchen mit erniedrigtem Fe^{2+}-Gehalt im Medium wurde die Fähigkeit des Deferoxamins (DFO), Eisenionen im extrazellulären Raum zu binden und damit dem Zellstoffwechsel zu entziehen, ausgenutzt. Die Daten sind im Folgenden dargestellt (Abb. 19 und 20).

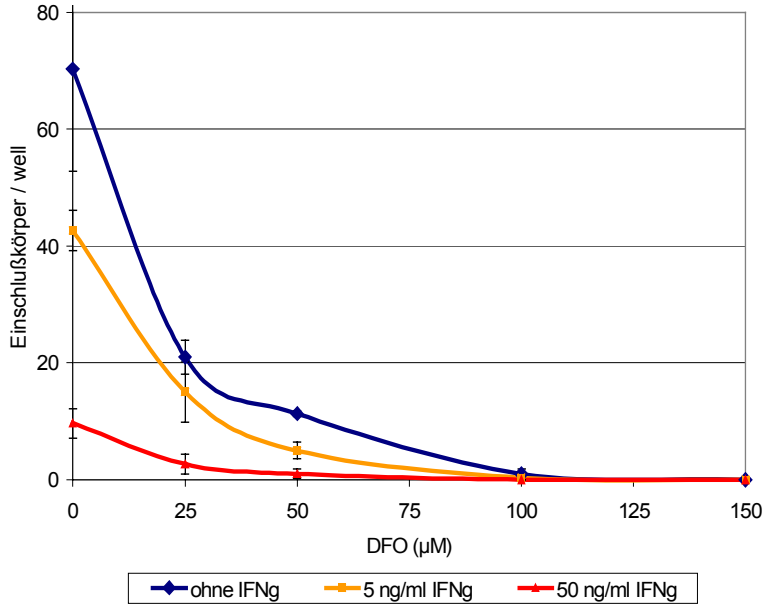

Abb. 19: Auswirkung des Entzuges freier Fe-Ionen auf die IFNγ-bedingte Entwicklungshemmung chlamydialer EK in THP-1-Zellen.
Die Zellen wurden 3-Tage (+/-IFNγ; +/-DFO) vorinkubiert, *CT*-infiziert (MOI 0,004) und weitere zwei Tage IFNγ-/DFO- behandelt. Dargestellt sind die EK/well 2d p.i. als Mittelwerte von 3-fach-Ansätzen +/-SD (1 repräsentatives von 3 Experimenten dargestellt).

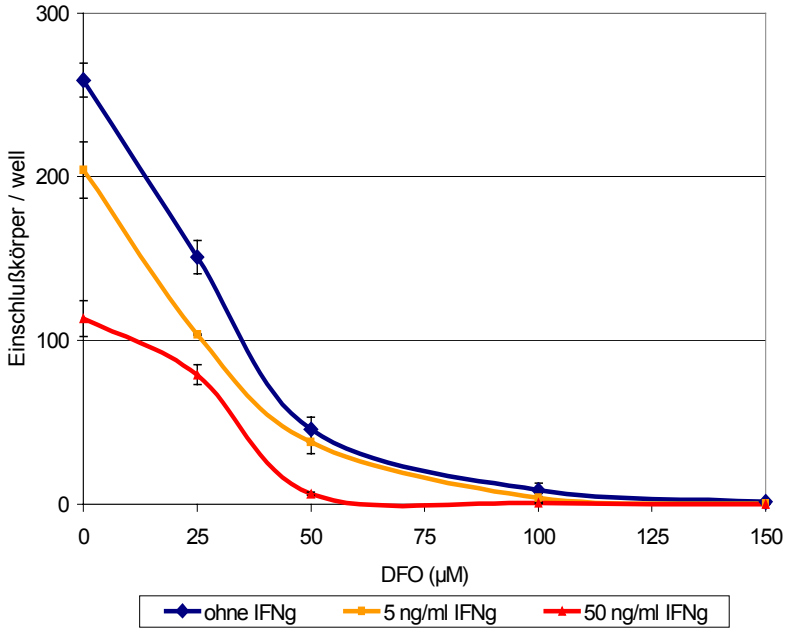

Abb. 20: Auswirkung des Entzuges freier Fe-Ionen auf die IFNγ-bedingte Entwicklungshemmung chlamydialer EK in HEp-2-Zellen.
Die Zellen wurden 3-Tage (+/-IFNγ; +/-DFO) vorinkubiert, *CT*-infiziert (MOI 0,001) und weitere zwei Tage IFNγ-/DFO- behandelt. Dargestellt sind die EK/well 2d p.i. als Mittelwerte von 3-fach-Ansätzen +/-SD (1 repräsentatives von 3 Experimenten dargestellt).

In diesem Experiment war die IFNγ-bedingte Inhibition der EK-Bildung bei beiden Zelllinien nicht so ausgeprägt, wie im vorher beschriebenen. Bei jeder der verwendeten IFNγ-Konzentrationen kam es durch Zugabe des Chelatbildners Deferoxamin (DFO) sowohl in THP-1- als auch in HEp-2-Zellen

konzentrationsabhängig zu einer weiteren Reduktion der Einschlußkörper pro well. Der IFNγ-Effekt wurde also durch DFO verstärkt. In Konzentrationsbereichen ab 100 µM starb ein Teil der Zellen ab, wie durch Trypanblau-Färbung der Zellen festgestellt wurde. In diesen Konzentrationsbereichen wurden in den wenigen noch vorhandenen Zellen nur noch sehr wenige oder keine Einschlüsse mehr festgestellt.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde untersucht, ob sich die durch DFO bewirkte EK-Reduktion, bzw. der zytotoxische Effekt von DFO bei Konzentrationen über 100 µM durch den Zusatz von freien Fe^{2+}-Ionen aufheben lässt. Dazu wurden THP-1- und HEp-2-Zellen gleichzeitig mit 150 µM Deferoxamin und verschiedenen $FeSO_4$-Konzentrationen vorinkubiert. Zum Vergleich wurden Zellen ohne DFO-Behandlung mit den gleichen $FeSO_4$-Konzentrationen untersucht. In Abb. 21 und 22 sind die Ergebnisse dieser Versuche graphisch dargestellt.

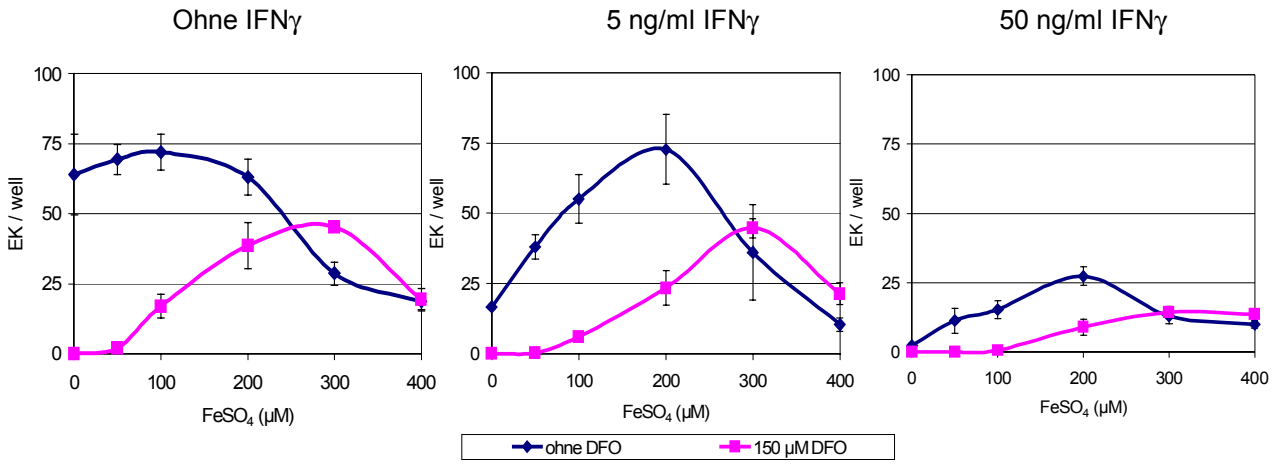

Abb. 21: Kompensationseffekt von Fe^{2+}-Ionen auf DFO-behandelte, vs. unbehandelte THP-1-Zellen bei verschiedenen IFNγ-Konzentrationen.
THP-1-Zellen wurden 3-Tage (+/- IFNγ; +/-DFO) vorinkubiert, *CT*-infiziert (MOI 0,004) und weitere zwei Tage +/-IFNγ; +/-DFO behandelt. Dargestellt sind die EK/well 2d p.i. als Mittelwerte von 3-fach-Ansätzen +/-SD (1 repräsentatives von 3 Experimenten dargestellt).

Eine Behandlung von THP-1-Zellen mit 150 µM DFO führte zu einem Absterben eines Teils der Zellen, sowie zu einer vollständigen Suppression der Einschlusskörper-Entwicklung. Durch den Zusatz von freien Fe^{2+}-Ionen stieg die Zahl der Einschlusskörper pro well wieder an. Im Vergleich zur nicht DFO-behandelten Kontrolle wurden so maximal 65% des DFO-Effektes aufgehoben. Eine vollständige Kompensation der DFO-Wirkung gelang bei THP-1-Zellen nicht. Sowohl bei nicht

IFNγ-behandelten, als auch bei IFNγ-behandelten Zellen wurde nur ein Teil der DFO-induzierten EK-Reduktion durch den Zusatz freier Fe^{2+}-Ionen kompensiert (Abb. 21).

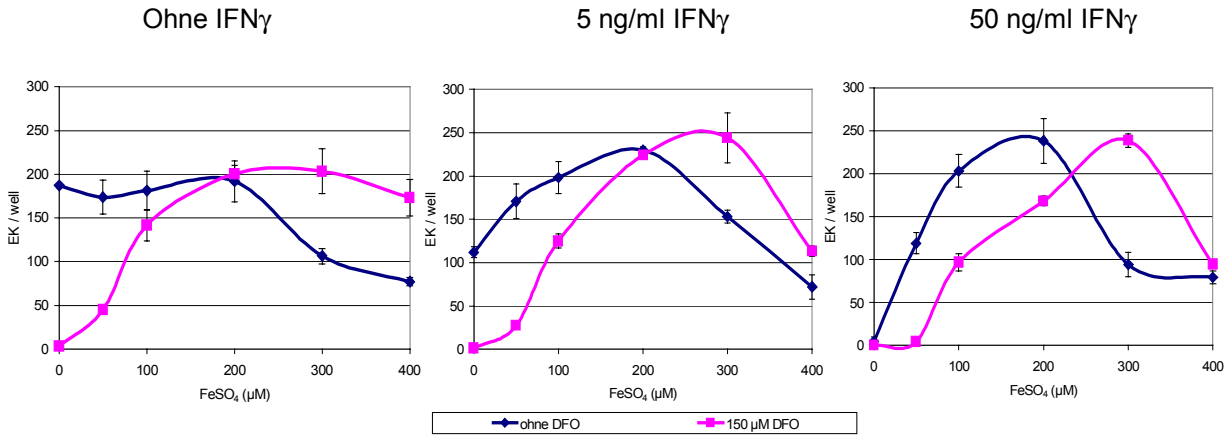

Abb. 22: Kompensationseffekt von Fe^{2+}-Ionen auf DFO-behandelte, vs. unbehandelte HEp-2-Zellen bei verschiedenen IFNγ-Konzentrationen.
HEp-2-Zellen wurden 3-Tage (+/- IFNγ; +/-DFO) vorinkubiert, *CT*-infiziert (MOI 0,001) und weitere zwei Tage +/-IFNγ; +/-DFO behandelt. Dargestellt sind die EK/well 2d p.i. als Mittelwerte von 3-fach-Ansätzen +/-SD (1 repräsentatives von 3 Experimenten dargestellt).

Der chlamydienhemmende, bzw. zytotoxische Effekt von 150 µM Deferoxamin supprimierte bei HEp-2-Zellen, wie bei THP-1-Zellen die EK-Entwicklung komplett. Durch den Zusatz freier Fe^{2+}-Ionen war dieser Effekt bei allen verwendeten IFNγ-Konzentrationen vollständig aufhebbar (Abb. 22). Dabei war die zur Kompensation des DFO-Effektes notwendige Konzentration an $FeSO_4$ höher, je höher die verwendete IFNγ-Konzentration war. Bei $FeSO_4$-Konzentrationen über 200 µM sank die EK-Zahl pro well, sowie die Vitalität der Zellen wieder ab, wie durch Trypanblau-Färbung gezeigt werden konnte.

5.2.3 Einfluss von Eisen auf die chlamydiale Persistenz in Monozyten

Nachdem zweiwertige Eisenionen sich im THP-1- und HEp-2-Infektionsmodell für *Chlamydia trachomatis* als wichtige Mediatoren zur Aufhebung der IFNγ-induzierten Reduktion der EK-Anzahl erwiesen haben, wurde die Wirkung freier Eisenionen auch in humanen peripheren Blutmonozyten (HPBM) untersucht. Dazu wurden HPBM aus peripherem Blut gewonnen und in Normalmedium unter Zusatz von verschiedenen Konzentrationen von $FeSO_4$ (50, 100 und 200 µM) für 2, 5, 8 und 18 Tage bei 37°C inkubiert. Kontrollmonozyten wurden ohne Zusatz von $FeSO_4$ inkubiert. Nach der Ernte der Monozyten wurden diese aufgeschlossen und zur Infektion von HEp-2-

Monolayern benutzt. Nach zwei Tagen wurde die Infektion gestoppt und die Monolayer mittels IPA gefärbt.
Zellaufschlüsse von Eisen-substituierten Chlamydien-infizierten Monozyten enthielten keine erhöhte Zahl infektiöser Chlamydien, als Kontrollmonozyten.
Es ergab sich somit keine Evidenz, dass Fe^{2+}-Ionen die Persistenz von Chlamydien in Monozyten aufheben und es zu einer produktiven Infektion kommt.

5.2.4 Einfluss von L-Tryptophan auf IFNγ-behandelte HEp-2- und THP-1-Zellen

Zu den in der Literatur diskutierten Faktoren, die für die chlamydiale Persistenz in epithelialen Zellen verantwortlich sind, zählt die Induktion des Enzyms Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO) durch IFNγ (ROTTENBERG et al., 2002). Die IDO katalysiert den einleitenden Schritt des Abbaus der für das Chlamydien-Wachstum essentiellen Aminosäure L-Tryptophan. In monozytären Zellen wird der IDO-induzierten Tryptophan-Degradation keine Relevanz zugeschrieben.
Die Unterschiede im Tryptophan-Stoffwechsel von THP-1- und HEp-2-Zellen wurden durch die im Folgenden beschriebenen Versuche näher analysiert. Dazu wurden HEp-2- und THP-1-Zellen mit verschiedenen IFNγ- und Tryptophan-Konzentrationen behandelt, *CT*-infiziert und hinsichtlich der Auswirkung auf die chlamydiale Einschlusskörper-Entwicklung untersucht.

Zunächst wurde die in der Literatur beschriebene, IFNγ-induzierte Hemmung der chlamydialen Entwicklung in HEp-2-Zellen und deren Aufhebbarkeit durch den Zusatz von L-Tryptophan (BEATTY et al., 1994c) mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Zellkultur-System reproduziert.
Durch IFNγ kam es in den epithelialen HEp-2-Zellen zu einer **Abnahme der Zahl,** sowie zu einer deutlichen **Größenreduktion** der entwickelten Einschlusskörper. Im dargestellten Versuch war die durch 50 ng/ml IFNγ induzierte Suppression der EK-Bildung allerdings nicht vollständig (vgl. Abb. 23). Ein Zusatz der Aminosäure L-Tryptophan führte schon beim Einsatz der geringsten verwendeten Konzentration (250 µM) zu einer kompletten Rekonstitution der EK-Größe, verglichen mit der Kontrolle ohne IFNγ.
Die Auswertung der EK-Anzahl pro well bei den verschiedenen IFNγ und L-Tryptophan-Konzentrationen ist in Abb. 24 dargestellt. Diese Daten zeigen, dass

Tryptophan die IFNγ-induzierte Suppression der EK-Zahl/well in HEp-2-Zellen nicht aufheben kann. Es kam in keinem Fall zu einer Vergrößerung der Anzahl der Einschlusskörper.

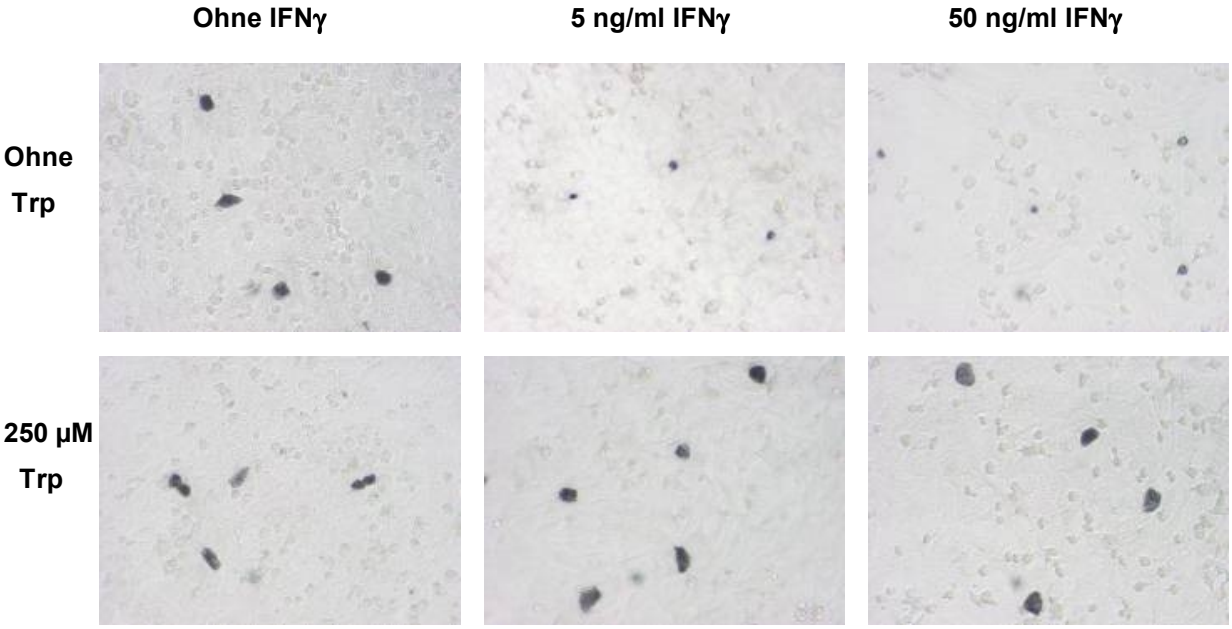

Abb. 23: Auswirkung von IFNγ und Tryptophan (Trp) auf die Größe der CT-Einschlüsse in HEp-2-Zellen 2d p.i..
Dargestellt sind typische Elementarkörper bei den angegebenen Konzentrationen von IFNγ und Tryptophan nach Anfärbung mittels IPA.

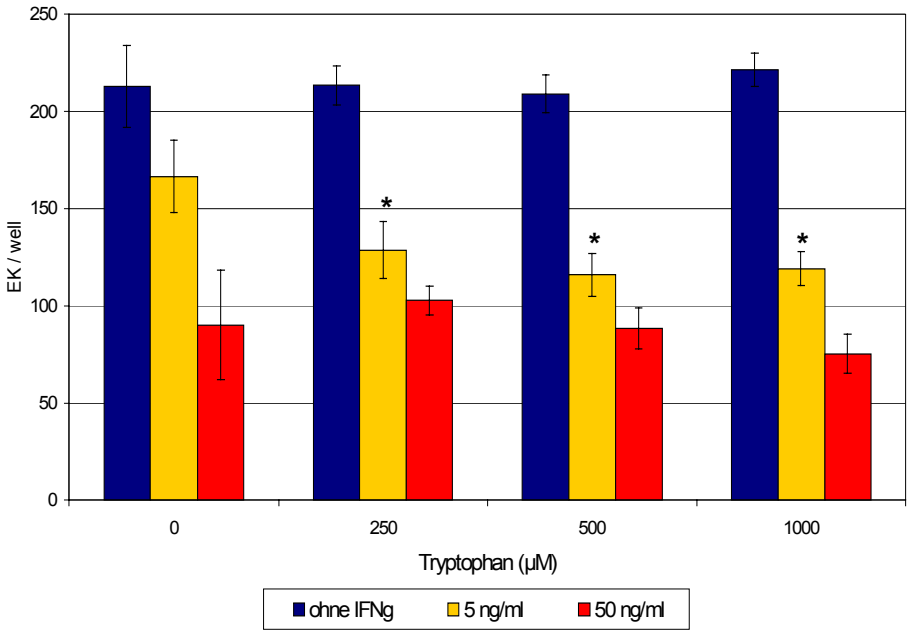

Abb. 24: Auswirkung von IFNγ und L-Tryptophan auf die chlamydiale EK-Zahl in HEp-2-Zellen.
HEp-2-Zellen (3d vorinkubiert +/- IFNγ; +/- Trp), infiziert mit *CT* (MOI 0,001) und bis zur Ernte 2d p.i. mit den jeweiligen Medien weiterinkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von 6-fach-Ansätzen. Im Student´schen t-Test wurden die Werte mit den jeweiligen Kontrollen (0 µM Trp) der entsprechenden IFNγ-Konzentration verglichen (∗: $p < 0,05$; 1/4 Experimenten).

In HEp-2-Zellen ohne IFNγ bewirkte L-Tryptophan keine signifikante Veränderung der Einschlusskörper-Anzahl pro well. Gleiches galt auch für HEp-2-Zellen die mit 50 ng/ml IFNγ behandelt wurden. Bei HEp-2-Zellen, die mit 5 ng/ml IFNγ inkubiert wurden kam es schon nach dem Zusatz von 250 µM Tryptophan zu einer deutlichen Reduktion der Einschlusskörper-Anzahl pro well (Reduktion relativ zur Kontrolle um bis zu 30%; alle Werte signifikant, $p < 0,05$).

Im Unterschied zu HEp-2-Zellen kam es in THP-1-Zellen auch bei nicht IFNγ-behandelten Zellen mit zunehmender Tryptophan-Konzentration im Medium zu einer signifikanten Suppression der **EK-Anzahl** pro well (48% Reduktion bei 1000 µM L-Tryptophan; vgl. Abb. 25). Bei IFNγ-behandelten Zellen reduzierte sich die Zahl der EK/well durch Tryptophan-Zusatz ebenfalls (bis ca. 40% bei 5 ng/ml IFNγ und bis 75% bei 50 ng/ml IFNγ).

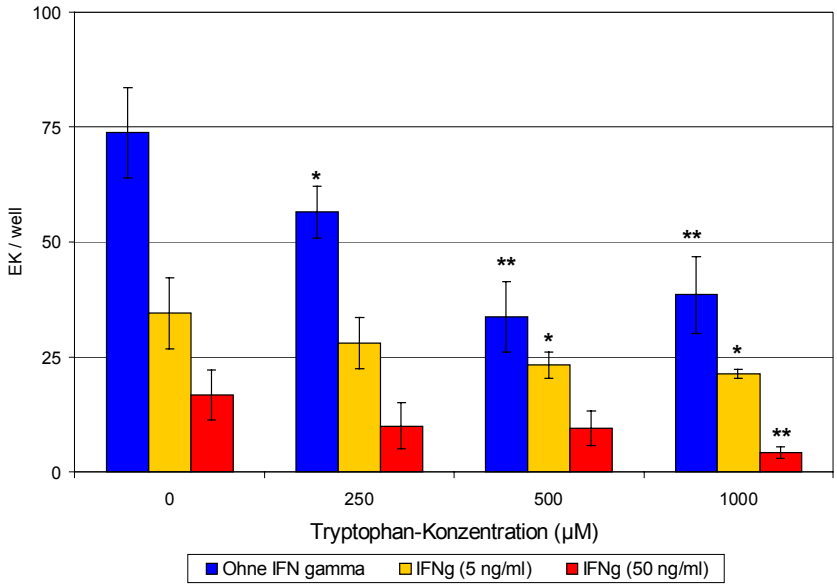

Abb. 25: Auswirkung von IFNγ und Tryptophan auf die chlamydiale EK-Zahl in THP-1-Zellen. THP-1-Zellen (3d vorinkubiert +/- IFNγ; +/- Trp), infiziert mit *CT* (MOI 0,004) und bis zur Ernte 2d p.i. mit den jeweiligen Medien weiterinkubiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von 6-fach-Ansätzen. Im Student´schen t-Test wurden die Werte mit den jeweiligen Kontrollen (0 µM Trp) der entsprechenden IFNγ-Konzentration verglichen (* < 0,05 und ** < 0,005; 1 repräsentatives von 4 Experimenten).

In THP-1-Zellen supprimierte Tryptophan die EK-Anzahl deutlicher als in HEp-2-Zellen. Auch in nicht IFNγ-behandelten THP-1-Zellen war die Reduktion der EK-Anzahl durch Tryptophan hochsignifikant. Die stärkste Suppression induzierten die höchsten IFNγ-Konzentrationen.

In einem anderen Auswertungsansatz wurde mit Hilfe der Bildauswertungs-Software AnalySIS® die mittlere sichtbare **EK-Fläche** von 100 bis 250 IPA-gefärbten *CT*-

Einschlusskörpern je IFNγ/Trp-Dosierung ermittelt. Die Auswertung der „Aufsicht"-Fläche stellt eine zweidimensionale Analyse eines dreidimensionalen Körpers dar. Sie ist mit der angewandten Technik die momentan beste Annäherung an das Volumen der Einschlusskörper.

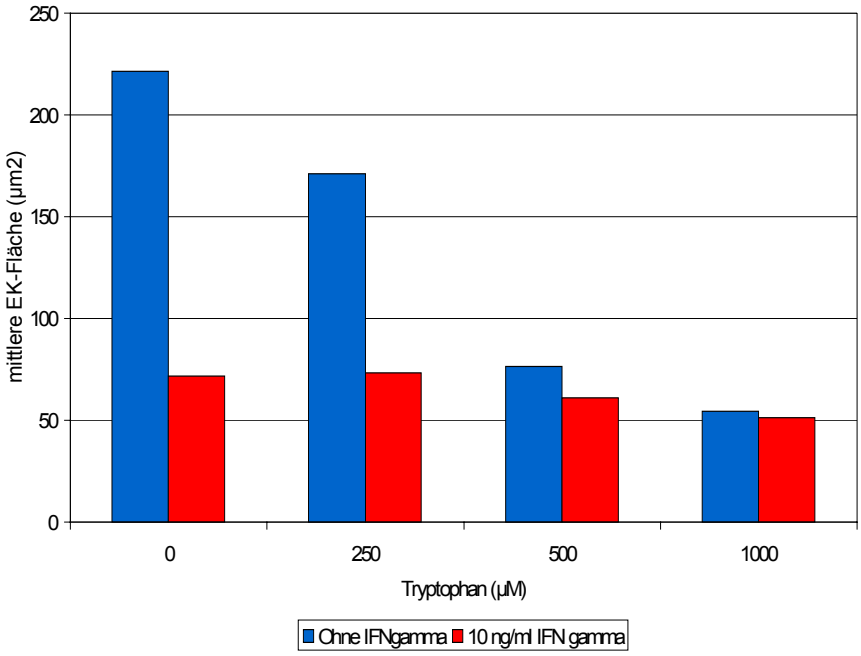

Abb. 26: Einfluss von Tryptophan auf die *CT*-EK-Größe in THP-1-Zellen.
THP-1-Zellen, vorinkubiert mit und ohne IFNγ und verschiedenen Trp-Konzentrationen wurden mit *CT* (MOI 0,01) infiziert und die Einschlusskörper 2d p.i. IPA-gefärbt. Die mittlere Fläche der EK wurde aus jeweils 100 – 250 EK ermittelt (1repräsentatives von 3 Experimenten).

In THP-1-Zellen wurde eine von der Tryptophan-Konzentration abhängige Reduktion der EK-Größe nachgewiesen. In Abb. 26 sind die Ergebnisse eines repräsentativen von drei Experimenten dargestellt. Besonders deutlich ist die von der Tryptophan-Dosis abhängige Suppression der sichtbaren EK-Fläche bei nicht IFNγ-behandelten Zellen (76% bei 1000 µM Trp). Die IFNγ-Behandlung bewirkte auch ohne zusätzlichen Tryptophan-Zusatz eine erhebliche Größen-Reduktion (67%). Unter Tryptophan-Zusatz reduzierte sich die sichtbare Fläche der EK noch einmal um ca. 30%.

Hohe Tryptophan-Konzentrationen allein können also eine fast ebenso starke Verminderung der Größe der EK bewirken, wie eine Behandlung mit 10 ng/ml IFNγ.

5.2.5 Einfluss von L-Alanin und L-Phenylalanin auf die EK-Entwicklung in IFNγ-behandelten HEp-2- und THP-1-Zellen

Nach der Analyse des Tryptophan-Effektes wurde untersucht, ob auch der Zusatz anderer Aminosäuren, wie L-Alanin und L-Phenylalanin eine Auswirkung auf die Zahl der Einschlußkörper nach einer chlamydialen Infektion hat. Dazu wurden Infektions-Versuche mit IFNγ-behandelten HEp-2- und THP-1-Zellen analog der Tryptophan-Behandlung durchgeführt.

THP-1-Zellen wurden ohne IFNγ und mit 5 und 50 ng/ml IFNγ inkubiert und mit 250, 500 und 1000 µM L-Alanin oder L-Phenylalanin als Zusatz im Kulturmedium behandelt. Normalmedium mit dem entsprechenden IFNγ-Zusatz und ohne den Zusatz dieser beiden Aminosäuren wurde bei den Kontrollzellen eingesetzt.

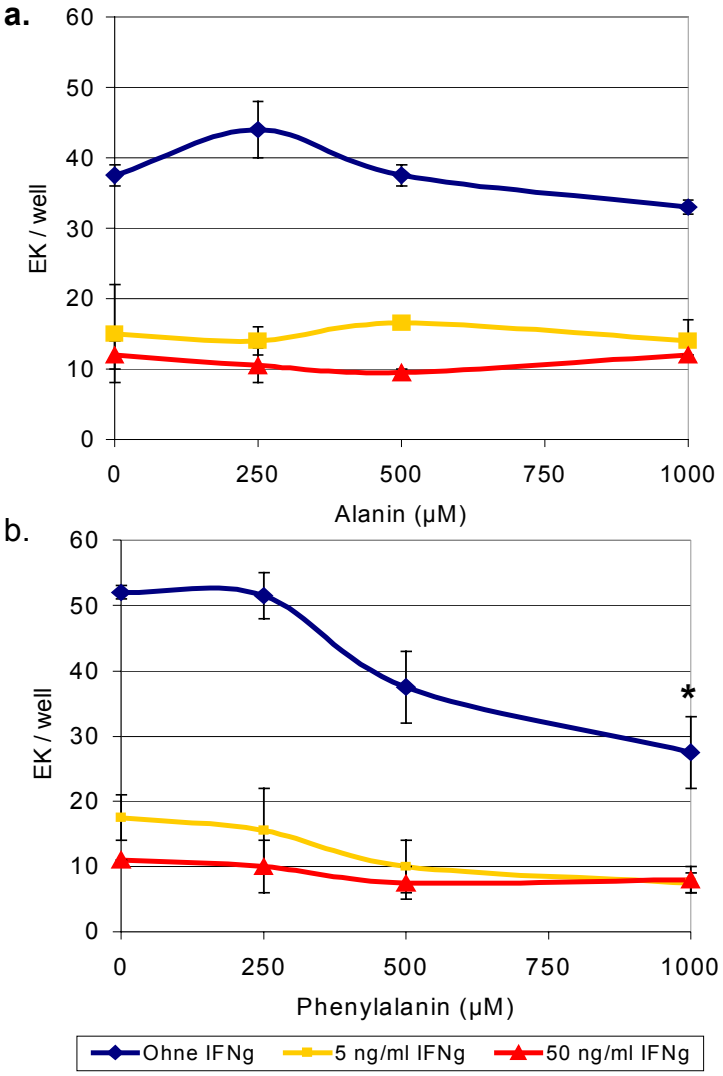

Abb. 27a, b: Auswirkung von L-Alanin (a), und L-Phenylalanin (b) auf die *CT*-EK-Anzahl in THP-1-Zellen.
Die Zellen wurden wie in den Tryptophan-Versuchen behandelt (siehe Abb. 25). Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelwerten eines Experimentes. Mittels t-Test wurden die Alanin- und Phenylalanin-abhängigen Werte mit den jeweiligen Nullwerten (ohne Ala, bzw. Phe) der entsprechenden IFNγ-Konzentration verglichen (* signifikant mit $p \leq 0{,}05$, 1 Experiment).

Durch IFNγ kam es in diesem Versuch mit THP-1-Zellen zu einer maximalen Reduktion der Einschlusskörper-Anzahl pro well von 70% (Alanin-Versuch) bis 80% (Phenylalanin-Versuch). Durch den Zusatz von Alanin ergaben sich bei keiner der eingesetzten Konzentrationen signifikante Veränderungen der Anzahl der EK pro well (Abb. 27a). Der Zusatz von Phenylalanin in der Konzentration von 1000 µM zum Normalmedium ohne IFNγ ergab eine Reduktion der EK/well um 27%, die eine signifikante Veränderung ($p < 0,05$) darstellt (Abb. 27b). Der Phenylalanin-abhängige leichte Abfall der Graphen der IFNγ-behandelten Zellen zeigt nicht signifikante Veränderungen an.

HEp-2-Zellen wurden wie THP-1-Zellen bei verschiedenen IFNγ-Konzentrationen (ohne IFNγ, 5 ng/ml IFNγ, 50 ng/ml IFNγ) mit 250, 500 und 1000 µM L-Alanin oder L-Phenylalanin als Zusatz im Kulturmedium behandelt. Die Kontrollzellen erhielten Normalmedium mit dem entsprechenden IFNγ-Zusatz ohne Zusatz dieser beiden Aminosäuren.

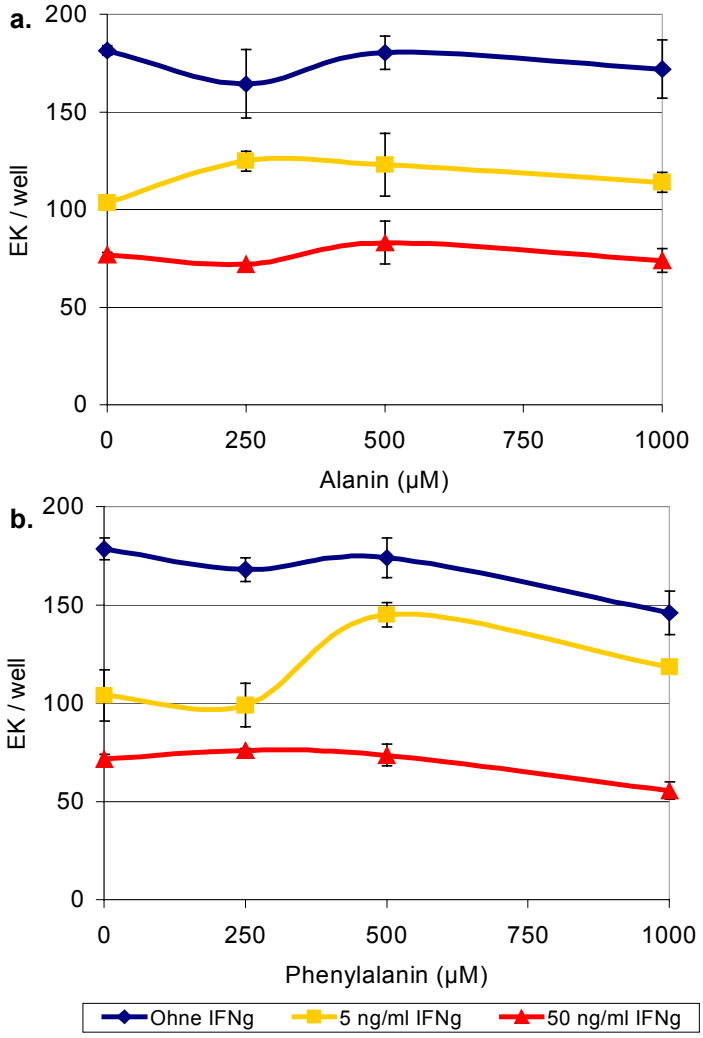

Abb. 28a, b: Auswirkung von L-Alanin (a), und L-Phenylalanin (b) auf die *CT*-EK-Anzahl in HEp-2-Zellen.
Die *CT*-infizierten (MOI 0,001) Zellen wurden wie in den Tryptophan-Versuchen behandelt (siehe Abb. 24). Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelwerten eines Experimentes.

Durch den Zusatz von L-Alanin oder L-Phenylalanin in den Konzentrationen 250, 500 und 1000 µM kam es bei keiner der verwendeten IFNγ-Dosen zu signifikanten Veränderungen der Zahl der Einschlusskörper pro well. Die beiden Aminosäuren haben in diesem System keine Auswirkung auf die chlamydiale Entwicklung (Abb. 28a, b).

5.2.6 Wirkung von 6-Chloro-D,L-Tryptophan auf die EK-Entwicklung in IFNγ-behandelten THP-1- und HEp-2-Zellen

Die Bedeutung des durch IFNγ induzierbaren Enzyms Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO) im Zusammenhang mit der tryptophanabhängigen Hemmung der chlamydialen Entwicklung sollte durch den Einsatz eines Hemmstoffs der IDO genauer untersucht werden. Das Tryptophananalogon 6-Chloro-D,L-Tryptophan (6-CDLT) ist als Hemmstoff des IDO-bedingten Tryptophan-Abbaus beschrieben. Es wurde zu IFNγ- und/oder L-Tryptophan-behandelten THP-1- und HEp-2-Zellen gegeben. L-Tryptophan und 6-CDLT wurden in den gleichen molaren Konzentrationen (250, 500 und 1000 µM) einzeln und in Kombination zu den Zellen hinzugefügt. Die Experimente wurden analog den Versuchen zum Tryptophan-Stoffwechsel durchgeführt. Als Kontrollen dienten die jeweils ohne L-Tryptophan oder 6-CDLT behandelten Zellen mit der entsprechenden IFNγ-Konzentration. Die nach der *CT*-Infektion entwickelten Einschlusskörper wurden hinsichtlich ihrer Anzahl und ihrem Erscheinungsbild untersucht.

Bei den Versuchen mit THP-1-Zellen kam es bei allen verwendeten IFNγ-Konzentrationen zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl der Einschlusskörper pro well mit steigender Konzentration an 6-Chloro-D,L-Tryptophan. Bei der höchsten verwendeten Konzentration an 6-CDLT (1000 µM) starb der größte Teil der Zellen ab und löste sich vom Boden der Kulturschale. Mit steigender IFNγ-Konzentration führten schon geringere 6-CDLT-Dosen zum teilweisen Absterben der Zellen. Die tryptophanbedingte Suppression der EK-Anzahl konnte durch 6-CDLT nicht aufgehoben werden. Im Gegenteil, durch den zusätzlichen Einsatz von 6-CDLT verstärkte sich der supprimierende Effekt sogar noch. In Abb. 29 sind exemplarisch die Ergebnisse der Auszählung der EK pro well bei IFNγ-behandelten (50 ng/ml) THP-1-Zellen dargestellt.

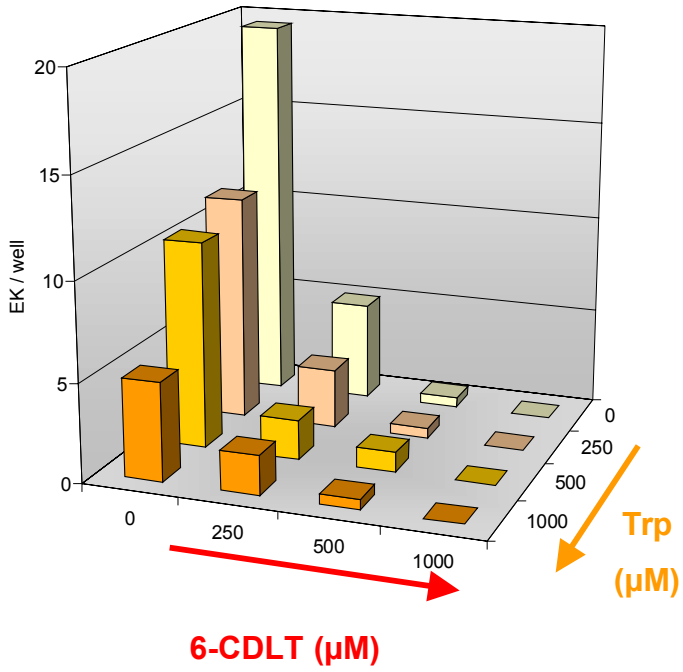

Abb. 29: Tryptophan- und 6-CDLT-Wirkung in IFNγ-behan-delten (50 ng/ml) THP-1-Zellen.
THP-1-Zellen wurden 3 Tage mit IFNγ und Trp/6CDLT vorbehandelt, *CT*-infiziert (MOI 0,004) und weitere 2 Tage mit den entsprechenden Medien weiterbehandelt. 2d p.i. erfolgte die Färbung mittels IPA und Auszählung der EK/well. Dargestellt sind Mittelwerte aus Doppelwerten (1 repräsentatives von 4 Experimenten).

Wie in Abb. 26 dargestellt verminderte sich die chlamydiale EK-Größe mit steigendem Tryptophan-Gehalt im Medium. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von 250 µM 6-CDLT komplett aufgehoben.

Betrachtet man allein die Wirkung von 6-Chloro-D,L-Tryptophan auf die *CT*-Infektion von IFNγ-behandelten THP-1-Zellen, so zeigte sich eine starke Abnahme der EK/well mit steigender 6-CDLT-Konzentration. Diese Veränderungen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen sind signifikant (vgl. Abb. 30).

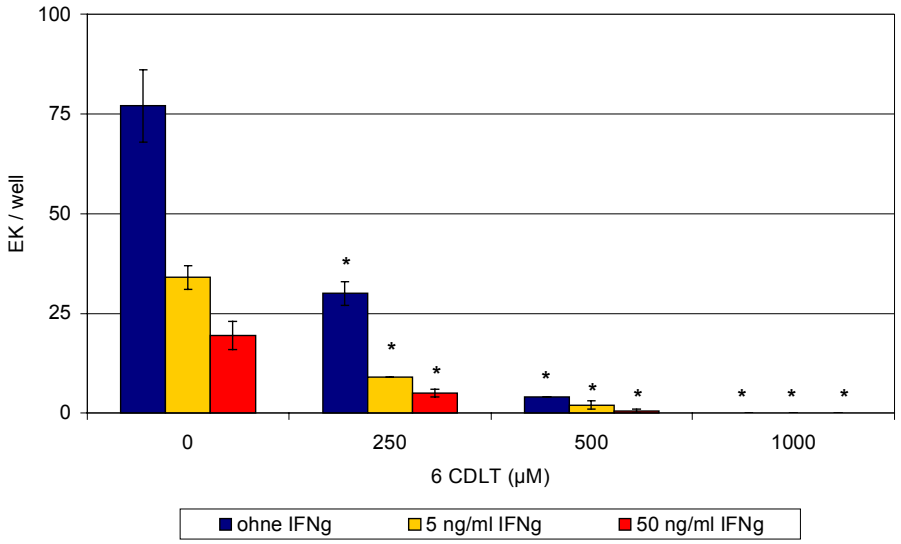

Abb. 30: Einfluss von 6CDLT auf die chlamydiale Entwicklung in THP-1-Zellen.
CT-infizierte (MOI 0,004) THP-1-Zellen (3d Vorinkubation +/-IFNγ; +/- 6CDLT) wurden bis zur Ernte 2d p.i. mit den entsprechenden Medien weiterbehandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelwerten der EK-Zahl/well mit den Standardabweichungen. Signifikante ($p < 0,05$) Veränderungen nach dem Student´schen t-Test sind durch Sterne markiert (1 repräsentatives von 4 Experimenten).

Zusammengefasst verstärkten Tryptophan und 6-CDLT die IFNγ-induzierte Suppression der Einschlusskörper-Entwicklung in THP-1-Zellen. Die Kombination beider Substanzen führte zu einer Verstärkung der Suppression gegenüber den Einzelwirkungen. 6-CDLT hob aber die tryptophanbedingte Verkleinerung der EK vollständig auf.

Die Auswirkungen der 6-CDLT/Tryptophan-Behandlung in HEp-2-Zellen waren denen in THP-1-Zellen sehr ähnlich. Die durch IFNγ induzierte Verkleinerung der Einschlusskörper waren nicht nur durch L-Tryptophan, wie in (5.2.4) beschrieben, sondern auch durch 250 µM 6-CDLT aufhebbar. Bei allen verwendeten IFNγ-Konzentrationen kam es aber zu einer deutlichen Reduktion der chlamydialen Einschlusskörper-Anzahl pro well mit steigender Konzentration an 6-Chloro-D,L-Tryptophan. Bei der Anwendung von 500 µM 6-CDLT waren die Einschlüsse deutlich kleiner, als bei der geringeren Konzentration. Dieser Effekt wurde noch durch steigende IFNγ-Konzentrationen verstärkt und war durch L-Tryptophan-Zusatz nicht aufhebbar. Bei der höchsten 6-CDLT-Konzentration von 1000 µM waren keine Einschlüsse mehr vorhanden, während analog dem THP-1-System der größte Teil der Zellen abgestorben und von der Unterlage abgelöst war.

5.2.7 Untersuchung der Wirkung von NO-Synthese-Hemmern

Zu den natürlichen monozytären Funktionen gehört die enzymatische Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin durch die Stickstoffoxidsynthetase (NOS). Es wurde untersucht, ob dieses System auch in der humanen Abwehrreaktion gegen *Chlamydia trachomatis* eine Rolle spielt. Dazu wurde einerseits zu dem im Normalmedium vorhandenen L-Arginin noch zusätzlich L-Arginin zum Medium gegeben und andererseits wurde der Effekt des Stickstoffoxidsynthetase-Hemmers N-Methyl-L-Arginin (L-NMMA) allein und zusammen mit L-Arginin untersucht. Zur Kontrolle von eventuellen toxischen Eigenschaften des L-NMMA wurde dessen Strukturanalogon N-Methyl-D-Arginin (D-NMMA), welches keine signifikante Wirkung auf die NOS ausübt eingesetzt. Beide Chemikalien wurden im THP-1- und HEp-2-System bei verschiedenen IFNγ-Konzentrationen untersucht.

Die Untersuchung von THP-1-Zellen hinsichtlich der chlamydialen EK-Entwicklung bei Vorbehandlung mit L-Arginin und L-NMMA ergaben die in Abb. 31 a und b dargestellten Ergebnisse. Der Zusatz von L-Arginin zum Medium (250, 500, 1000 µM) bewirkte keine signifikanten Veränderungen der chlamydialen Entwicklung im Vergleich zu den Kontrollen. Ein leichter, nicht signifikanter Abfall der Einschlusskörper-Anzahl pro well ergab sich bei nicht IFNγ-behandelten Zellen im Bereich von 500 bis 1000 µM L-Arginin im Medium. Bei Zusatz von 250 bis 500 µM des NOS-Hemmers L-NMMA kam es zu einer leichten aber statistisch signifikanten Reduktion (~20%) der EK-Anzahl pro well bei nicht IFNγ-behandelten THP-1-Zellen. Bei THP-1-Zellen, die mit 5 ng/ml IFNγ vorinkubiert wurden, kam es im gleichen Konzentrationsbereich von L-NMMA ebenfalls zu einem leichten Abfall der Kurve. Diese Veränderung war aber nicht signifikant. Bei Zellen, die mit 50 ng/ml IFNγ behandelt wurden, ergaben sich durch den Zusatz von L-NMMA keinerlei Veränderungen der EK-Anzahl pro well. Die Prüfung auf toxische Nebenwirkungen des L-NMMA erfolgte durch Einsatz des L-NMMA-Struktur-Analogons D-NMMA. Diese Substanz bewirkte keine Veränderung der chlamydialen Entwicklung und der Vitalität der Zellen.

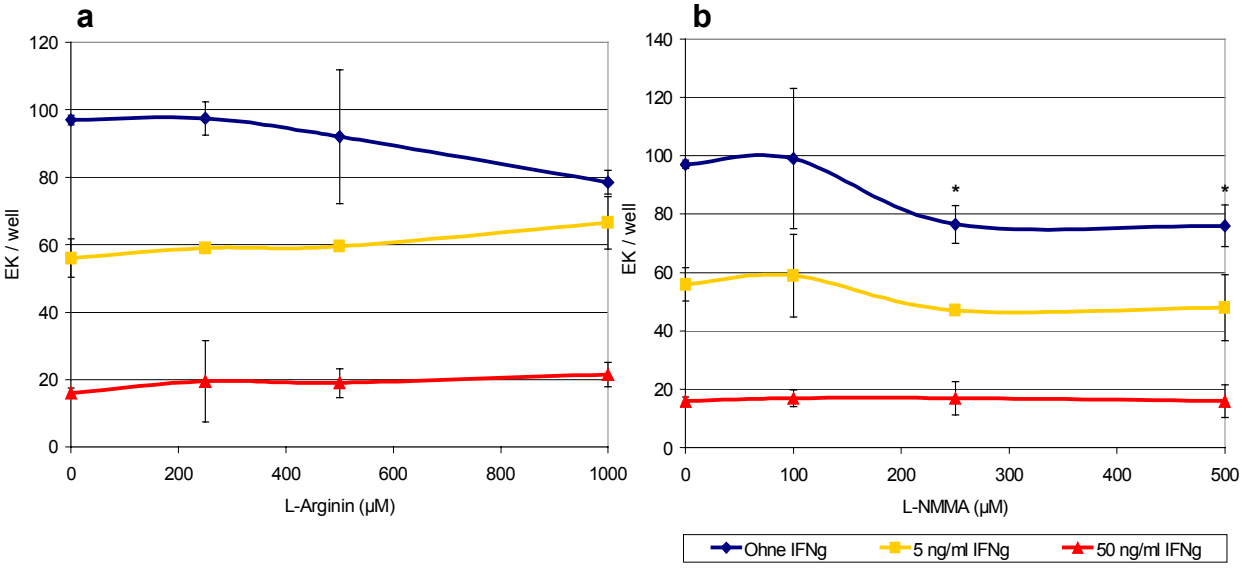

Abb. 31: L-Arginin- (a) und L-NMMA-Wirkung (b) in Abhängigkeit von der IFNγ-Konzentration in THP-1-Zellen.
THP-1-Zellen wurden 3 Tage +/- L-Arg, bzw. L-NMMA vorinkubiert. Nach der *CT*-Infektion (MOI 0,004) wurden die Zellen bis 2d p.i. weiterbehandelt. Die EK/well sind als Mittelwerte aus Doppelwerten (+/- SD) dargestellt (1 Experiment).

Der Einfluss von L-Arginin und L-NMMA auf die Einschlusskörper-Entwicklung von *CT* in HEp-2-Zellen wurde analog den THP-1-Versuchen untersucht. L-Arginin wurde in den Konzentrationen 250, 500 und 1000 µM und L-NMMA in den Konzentrationen 100, 250 und 500 µM eingesetzt. Als Kontrollen dienten nicht mit L-Arginin- oder L-NMMA-behandelte Zellen, sowie D-NMMA-behandelte Zellen.

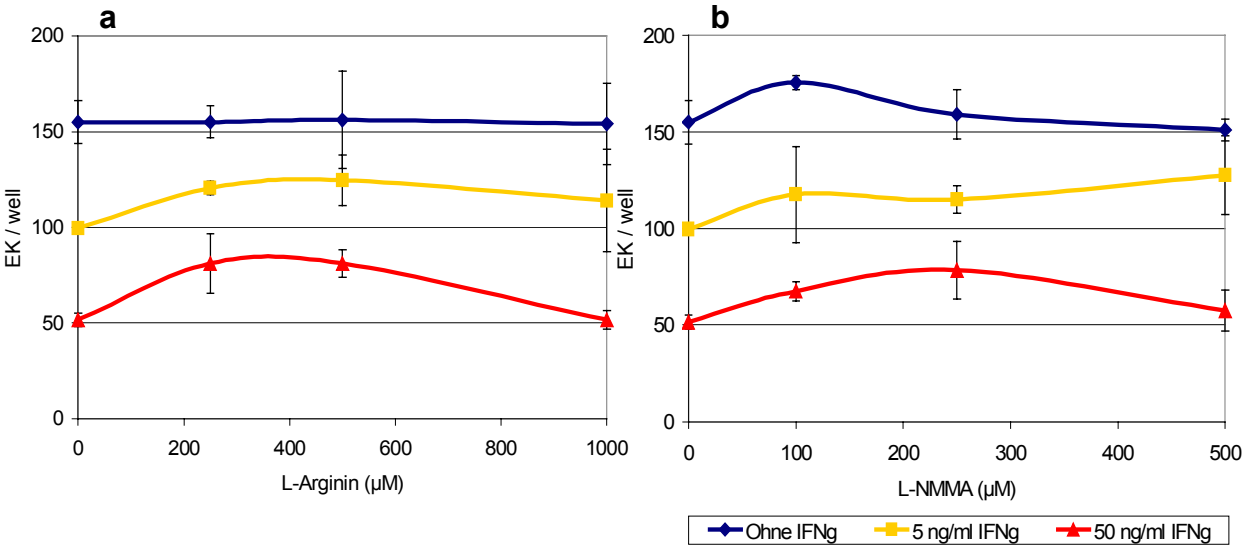

Abb. 31a, b: L-Arginin- (a) und L-NMMA-Wirkung (b) in Abhängigkeit von der IFNγ-Konzentration in HEp-2-Zellen.
HEp-2-Zellen wurden 3 Tage +/- L-Arg, bzw. L-NMMA vorinkubiert. Nach der *CT*-Infektion (MOI 0,001) wurden die Zellen bis 2d p.i. weiterbehandelt. Die EK/well sind als Mittelwerte aus Doppelwerten (+/- SD) dargestellt (1 Experiment).

Sowohl durch den Zusatz von L-Arginin, als auch durch den Zusatz des NOS-Hemmers L-NMMA wurde in HEp-2-Zellen kein eindeutiger, signifikanter Einfluss auf die chlamydiale Infektion, bzw. die Entwicklung der Einschlusskörper verursacht (Abb. 31a, b). Das Erscheinungsbild der Einschlusskörper hat sich bei keiner der Behandlungen verändert. Auch die Kombination von L-NMMA und L-Arginin hatte keine Auswirkungen auf die chlamydiale Entwicklung in HEp-2-Zellen.

5.3 Teil III: Induktion von Entzündungsmediatoren durch chlamydiale Infektionen in Monozyten

Chlamydien-infizierte humane periphere Blutmonozyten (HPBM) stellen ein *in vitro* relevantes Persistenz-System dar. In diesem System wurde die Synthese des Entzündungs-Mediators Prostaglandin E_2 untersucht. Dazu wurden Monozyten über Ficoll®-Separation und anschließende Plastikadhärenz isoliert und mit *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydophila pneumoniae* infiziert. Als Kontrollen dienten scheininfizierte Monozyten und mit *E. coli*-LPS stimulierte Monozyten. Auch die PGE_2-induzierende Potenz von *Mycoplasma fermentans* auf Monozyten wurde zum Vergleich mit Chlamydien infizierten HPBM untersucht.

5.3.1 Zeitverlauf der E. coli-LPS- und Chlamydien-induzierten PGE_2-Synthese

Um den optimalen Zeitpunkt zur Untersuchung der Prostaglandin-Synthese zu ermitteln wurde das Profil der LPS-, bzw. *CT*- und *CP*-induzierten PGE_2-Bildung von HPBM aus einem buffy coat über 240 Stunden (10 Tage) ermittelt. Überstände wurden nach 2, 6, 24, 48, 72, 120, 168 und 240 Stunden entnommen und jeweils durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Mengen gebildeten Prostaglandins wurden mit dem PGE_2-ELISA ermittelt. Die Kontrolle der Infektion erfolgte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (Abb. 32a, b).

a: *C. trachomatis*-infizierte HPBM **b: *C. pneumoniae*-infizierte HPBM**

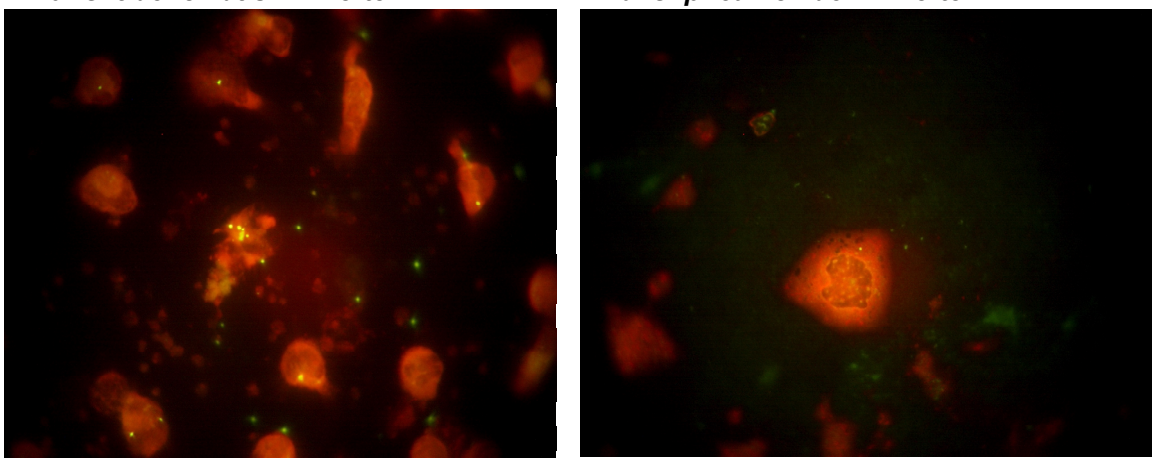

Abb. 32: Humane periphere Blutmonozyten, 3 Tage nach Infektion mit *CT* (a) und *CP* (b).
HPBM wurden mit Chlamydien der MOI 5 infiziert und nach 3 Tagen Kultur fixiert und gefärbt. In einigen Zellen sind gelblich-grün fluoreszierende Chlamydien-Partikel zu erkennen. (a: Färbung mit dem *CT*-spezifischen FITC-konjugierten anti-MOMP-Antikörper; b: Färbung mit dem IMAGEM™ *CP*-Immunfluoreszenztest).

Das Profil der Prostaglandin E_2-Synthese zeigte einen starken Anstieg der Konzentration gebildeten Prostaglandins innerhalb der ersten 24 Stunden (bis auf 9000 pg/ml, vgl. Abb. 33a). Innerhalb der nächsten 48 Stunden sanken die Mengen gebildeten Prostaglandins wieder bis auf Werte um 1000 pg/ml ab. Nach sieben Tagen war kein PGE_2 mehr messbar. Die unstimulierte Kontrolle zeigte nur eine geringe PGE_2-Produktion 48 Stunden nach Infektion (ca. 200 pg/ml).

Das zeitliche Profil der Prostaglandin-Synthese von *CT*, bzw. *CP* entspricht im Wesentlichen dem der LPS-induzierten PGE_2-Synthese, wenn die gebildeten PGE_2-Mengen auch deutlich geringer waren (Abb. 33 a, b). Die *CP*-induzierte Prostaglandin-Produktion hielt etwas länger an, als die *CT*-induzierte.

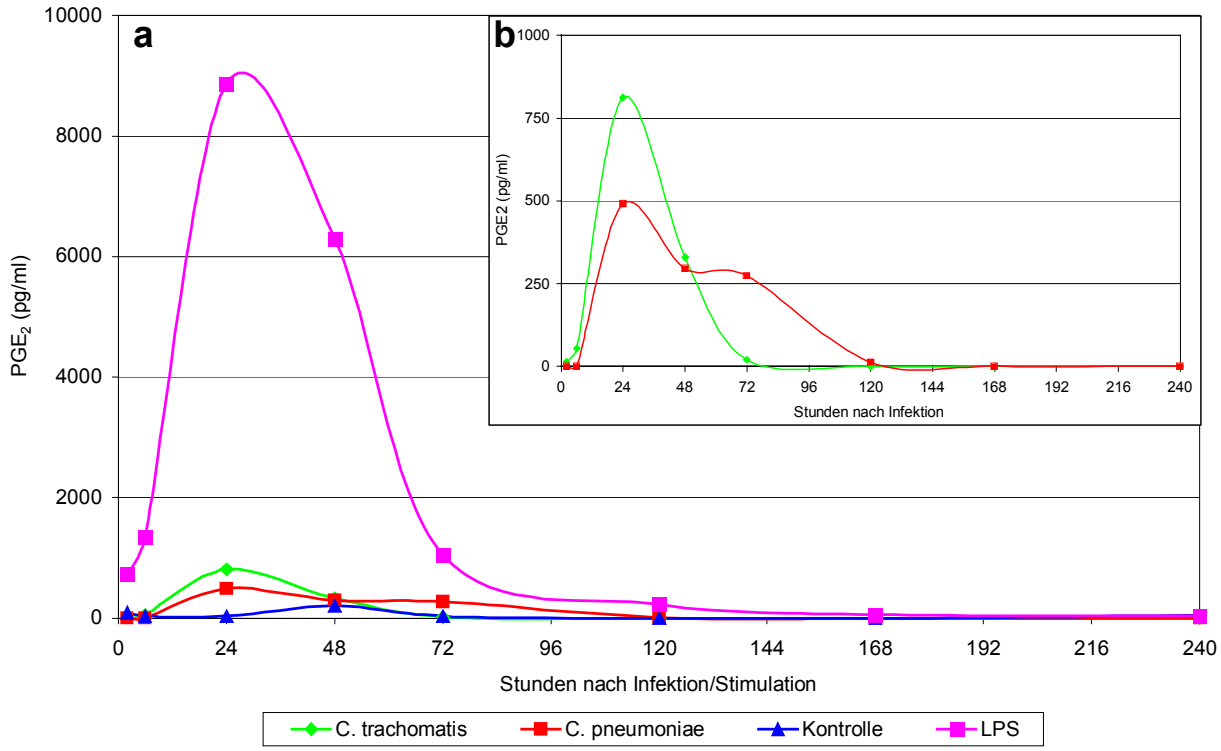

Abb. 33: Zeitverlauf der LPS- und Chlamydien-induzierten PGE_2-Synthese in HPBM.
HPBM aus einem buffy coat wurden mit 10 µg/ml *E. coli*-LPS stimuliert, bzw. mit *CT*, bzw. *CP* (MOI 1) infiziert. Nach 2, 6, 24, 48, 72, 120, 168 und 240 Stunden wurden die Überstände durch frisches Kulturmedium ersetzt und auf gebildetes PGE_2 untersucht. Als Kontrollen dienten scheininfizierte Monozyten. Diagramm **a** zeigt die PGE_2-Produktionen aller Stimuli, **b** zeigt allein die Chlamydien-induzierten PGE_2-Mengen in einer größeren Auflösung (1 Experiment).

5.3.2 Individuelle Variabilität der PGE_2-Synthese von HPBM nach Stimulation mit E. coli-LPS

Von 27 gesunden Personen aus der Abteilung Rheumatologie der Medizinischen Hochschule Hannover wurden HPBM gewonnen und mit 10 µg/ml *E. coli*-LPS stimuliert. Die Monozyten wurden in DC-Medium für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die Kulturüberstände mittels PGE_2-ELISA auf gebildetes Prostaglandin E_2 untersucht.

Die Mengen gebildeten Prostaglandins variierten spenderabhängig sehr stark (vgl. Abb. 34). Die Monozyten von sieben Personen produzierten mehr als 30 ng/ml PGE_2. In einem zweiten Experiment reproduzierbar hohe PGE_2-Synthese-Raten wurden nur bei 4 von 27 Spendern gefunden (Nr. 1, 2, 4, 5). Die Monozyten dieser Personen wurden für weitere Analysen benutzt.

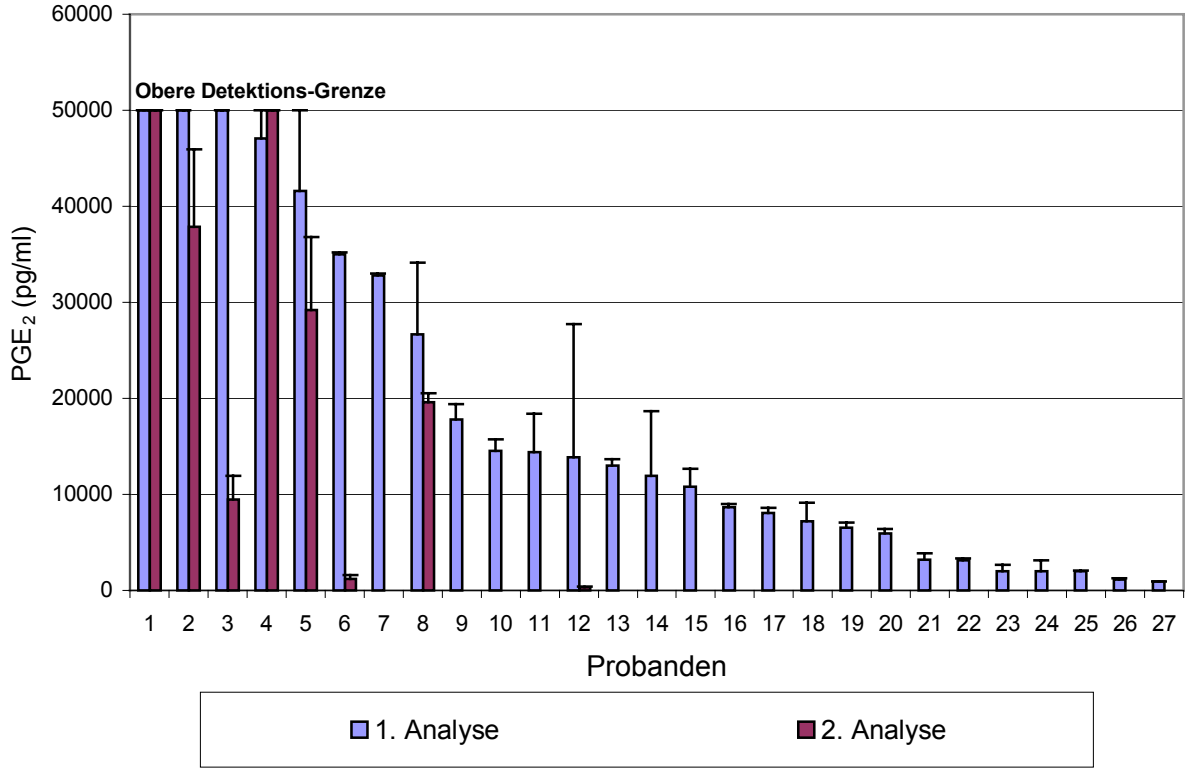

Abb. 34: Individuelle Variabilität der *E. coli*-LPS-induzierten monozytären PGE_2-Synthese 24h nach Stimulation.

HPBM von 27 Blutspendern wurden jeweils mit 10 µg/ml *E. coli*-LPS stimuliert und die Kulturüberstände nach 24 Std. auf gebildetes PGE_2 untersucht. Bei einigen Spendern wurde der Versuch ein zweites Mal durchgeführt. Die Daten stellen die Mittelwerte (+/- SD) der jeweiligen Doppelbestimmungen dar.

5.3.3 PGE_2-Synthese von HPBM nach Infektion mit Chlamydien und/oder Mycoplasmen

In weiteren Versuchen wurden HPBM der ausgewählten Spender mit starker „Prostaglandin-Antwort“ auf *E. coli*-LPS mit *CT*, *CP* oder *Mycoplasma fermentans* infiziert. Die Prostaglandin-Synthese-Raten der verschiedenen Erreger, die Abhängigkeit von der Stimulationsdauer sowie die MOI-Abhängigkeit der chlamydialen PGE_2-Synthese wurden untersucht. Im Unterschied zu den Versuchen zum zeitlichen Profil der PGE_2-Synthese wurden die HPBM der folgenden Versuche, als voneinander unabhängige Proben bis zu den Zeitpunkten 24 und 72 Stunden nach Infektion inkubiert. Bis zur Ernte verblieb das Kulturmedium jeweils in den Kulturschalen, so dass sich das gebildete Prostaglandin bis zur jeweiligen Ernte anreichern konnte.

5.3.3.1 Erregerabhängigkeit der PGE_2-Synthese durch HPBM

HPBM wurden mit *CT*, *CP* (jeweils MOI 5) oder *Mycoplasma fermentans* (HPBM : Mycoplasmen-Verhältnis 1 : 1) infiziert. Als Kontrollen dienten scheininfizierte sowie mit 10 µg/ml *E. coli*-LPS-stimulierte HPBM. Die Überstände der Kulturen wurden 24 h nach Infektion geerntet und auf gebildetes PGE_2 untersucht.

In Abb. 35 sind die Ergebnisse der Analysen dargestellt. Scheininfizierte HPBM synthetisierten niedrige Prostaglandin-Mengen (0,5 – 1 ng/ml), während mit Lipopolysaccharid von *E. coli* stimulierte Monozyten hohe Mengen an Prostaglandin E_2 sezernierten (15 – 40 ng/ml).

CT- und *CP* –Infektionen von HPBM induzierten ebenfalls eine PGE_2-Synthese. Verglichen mit der Negativ-Kontrolle produzierten *C. trachomatis* (MOI 5) infizierte HPBM 10 – 20 fach höhere PGE_2-Mengen. Diese waren aber deutlich geringer, als die nach *E. coli*-LPS-Stimulation synthetisierten Mengen (ca. 60 – max. 80% der LPS-Kontrolle). Die *CP* (MOI 5) -Induktionsrate überstieg die der Negativ-Kontrolle nur um das 3 - 5-fache und erreichte nur ca. 20% der durch *CT* (MOI 5) induzierten Menge an Prostaglandin E_2.

Mycoplasma fermentans konnte ebenfalls eine Prostaglandin E_2-Synthese in Monozyten induzieren. Die sezernierte Menge lag im Bereich der durch *CT* oder *CP* induzierten PGE_2-Mengen.

Die kombinierte Infektion mit *CT* und *M. fermentans* oder *CP* und *M. fermentans* hatte einen additiven Effekt auf die Prostaglandin-Synthese der HPBM, verglichen mit der durch die einzelnen Erreger induzierten Mengen.

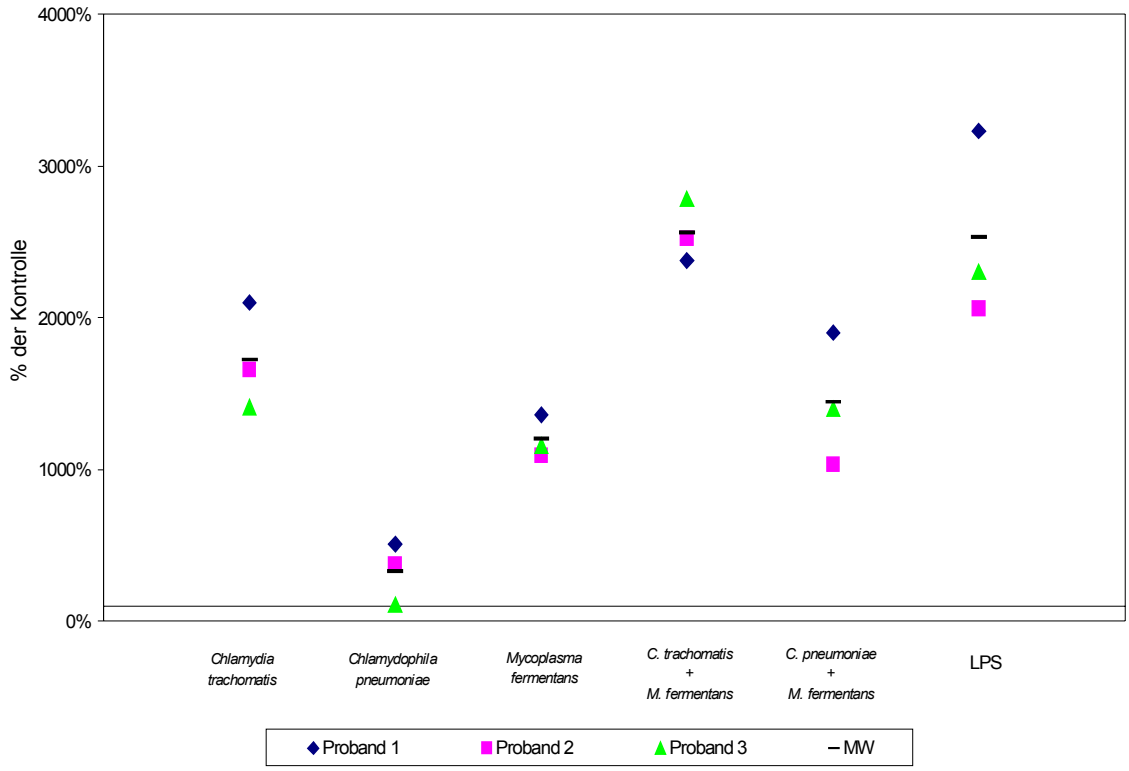

Abb. 35: PGE_2-Synthese von HPBM dreier Probanden 24h nach *CT*, *CP* und/oder *M. fermentans*-Infektion.
HPBM wurden mit *CT* (MOI 5), *CP* (MOI 5) und/oder *M. fermentans* (initiales HPBM : Mycoplasmen-Verhältnis 1:1) infiziert. Scheininfizierte HPBM dienten als Negativ-Kontrolle, *E. coli*-LPS (10 µg/ml) stimulierte HPBM als Positiv-Kontrolle der PGE_2-Synthese. Die Kulturüberstände wurden 24h p.i. auf PGE_2 untersucht und die Daten (Mittelwerte aus Doppelwerten) relativ zur Negativ-Kontrolle dargestellt. MW: Mittelwert der Probanden (1 repräsentatives von 4 Experimenten).

5.3.3.2 Abhängigkeit der erregerinduzierten PGE_2-Synthese durch HPBM von der Inkubationsdauer

CT, *CP* (jeweils MOI 5) oder *Mycoplasma fermentans* (HPBM : Mycoplasmen-Verhältnis 1 : 1) infizierte HPBM wurden 24 und 72 Stunden kultiviert und die Mengen gebildeten Prostaglandins bis zu diesen Zeitpunkten analysiert. Als Kontrollen dienten *E. coli*-LPS-stimulierte und scheininfizierte HPBM.

Aufgrund des *E. coli*-LPS-Stimulus kam es zu einem starken Anstieg der gebildeten Prostaglandin-Mengen zwischen Tag 1 und Tag 3. Bis zu 40 ng/ml PGE_2 wurden nach 72 Stunden akkumuliert. Bei den anderen untersuchten bakteriellen Stimuli

wurde die nach 24 Stunden gebildete PGE_2-Menge innerhalb der nächsten zwei Tage kaum gesteigert.

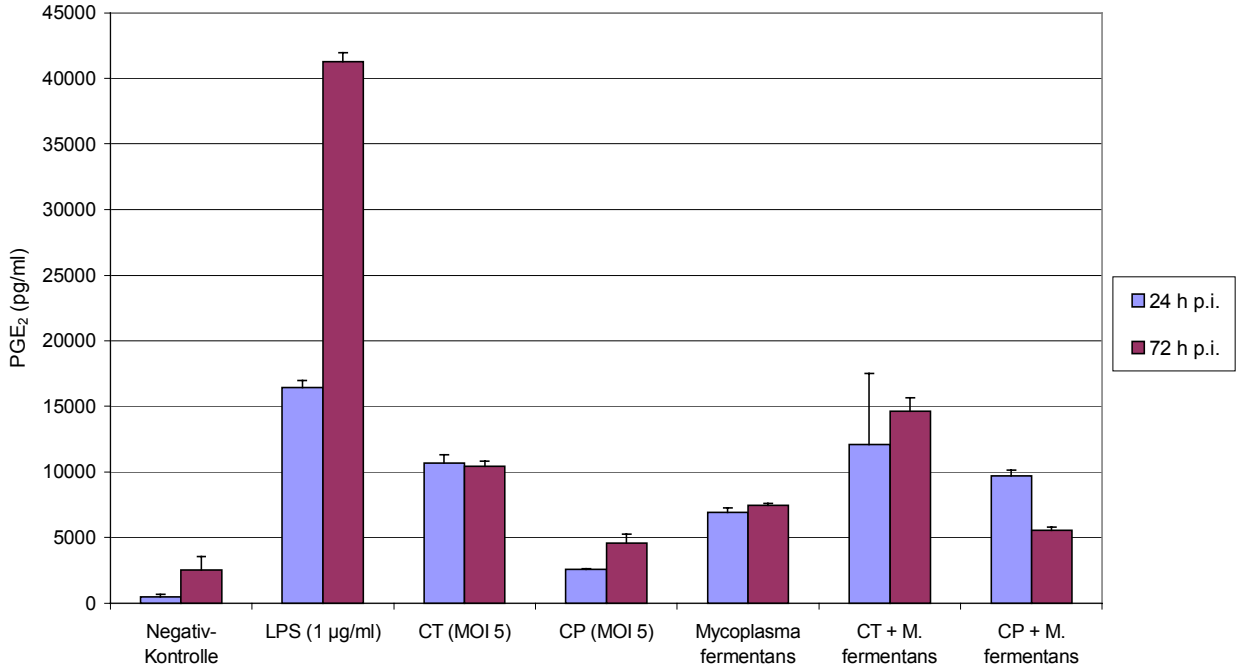

Abb. 36: Zeitabhängige Akkumulation von PGE_2 durch HPBM, infiziert mit *CT*, *CP* und/oder *M. fermentans*.
HPBM, infiziert mit *CT*, *CP* (MOI 5) und/oder *M. fermentans* (HPBM : Mycoplasmen-Verhältnis 1 : 1) wurden 24 und 72 h inkubiert. Scheininfizierte und mit *E. coli*-LPS stimulierte HPBM dienten als Kontrollen. Die gebildeten PGE_2–Mengen stellen Mittelwerte (+/- SD) von Doppelwerten dar (1 repräsentatives von 4 Experimenten).

5.3.3.3 MOI-Abhängigkeit der Chlamydien-induzierten PGE_2-Synthese

Der Einfluss der infektiösen Dosis auf die Menge synthetisierten Prostaglandins wurde untersucht, indem *CT* und *CP* in den MOI 1, 5 und 10 zur Infektion von HPBM eingesetzt wurden. Die Konzentration angereicherten PGE_2 in den Kulturüberständen wurde an Tag 1 und Tag 3 nach Infektion bestimmt.

In zwei voneinander unabhängigen Experimenten wurde eine von der MOI der Chlamydien abhängige Prostaglandin E_2-Synthese festgestellt. Bei beiden Chlamydien-Spezies stieg die Menge gebildeten Prostaglandins mit der infektiösen Dosis an (Abb. 37). Auch in diesem Experiment konnte wieder beobachtet werden, dass die *E. coli*-LPS-induzierte Prostaglandin-Synthese von Tag 1 bis Tag 3 noch deutlich anstieg, während es Chlamydien-induziert im Zeitraum zwischen 24 und 72 Stunden nach Infektion zu keinem signifikanten Anstieg der PGE_2-Synthese kam.

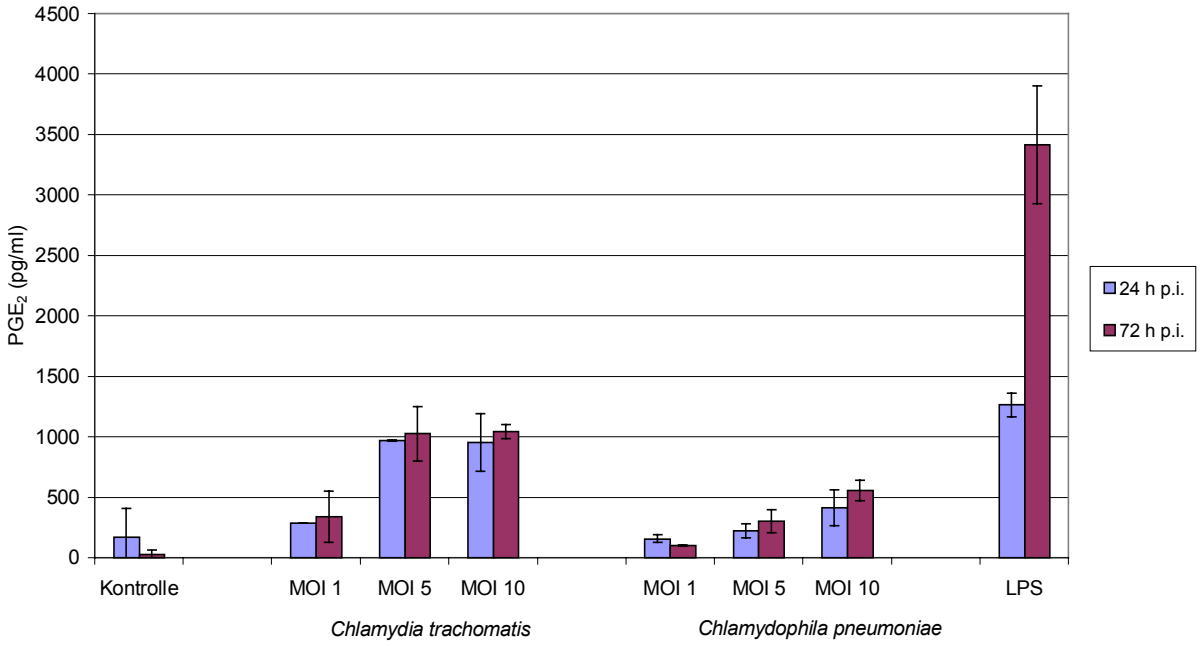

Abb. 37: MOI-Abhängigkeit der Chlamydien-induzierten PGE_2-Synthese.
HPBM von zwei Probanden wurden jeweils mit verschiedenen MOI von *CT* und *CP* infiziert und die Kulturüberstände an Tag 1 und Tag 3 nach Infektion auf PGE_2 untersucht. Die Daten stellen Mittelwerte (+/- SD) der jeweiligen Doppelbestimmungen der beiden Probanden dar.

5.3.3.4 Messung der Expressionsstärke des cox-2-Gens

Ein Schlüsselenzym der Prostaglandin-Synthese in Monozyten ist die Cyclooxygenase-2 (Cox-2). Die Expression der Cox-2 kontrolliert damit die Prostaglandin-Bildung. In den nachfolgenden Experimenten wurde die Stärke der Expression des cox-2-Gens untersucht. Dazu wurden HPBM mit *Chlamydia trachomatis* der MOI 5 infiziert, die Zellen nach 1, 3 und 6 Tagen geerntet und zur RNA-Präparation für die Real-time-RT-PCR verwendet (vgl. Abb. 38). Im Vergleich zur Expression des Ribosomalen Protein S9 (RPS9; housekeeping-Gen) wurde die relative Genexpression für die Cyclooxygenase-2 bestimmt.

Aufgrund des *E. coli*-LPS-Stimulus kam es, relativ zur Expression der RPS9-mRNA an Tag 1 p.i. zu einer starken Expression von cox-2-mRNA (1768-fach gegenüber der scheininfizierten Kontrolle (vgl. Abb. 38). Bis zum Tag 3 nach Infektion fiel die Expression um 58% und bis zum Tag 6 nach Infektion um 67% relativ zur Expression an Tag 1 p.i. ab. Insgesamt war die Expression der cox-2-mRNA *E. coli*-LPS-induziert über den gesamten untersuchten Zeitraum sehr ausgeprägt.
Obwohl die *CT*-Infektion in HPBM (MOI 5) zu einer fast 100-fach stärkeren Expression des cox-2-Gens an Tag 1 p.i. gegenüber der scheininfizierten Kontrolle führte, erreichte sie nur 6% der *E. coli*-LPS-stimulierten Kontrolle. Auch sie fiel

innerhalb der nächsten Tage nach Infektion deutlich ab (um 87% bis Tag 3 p.i., bzw. 62% bis Tag 6 p.i.).

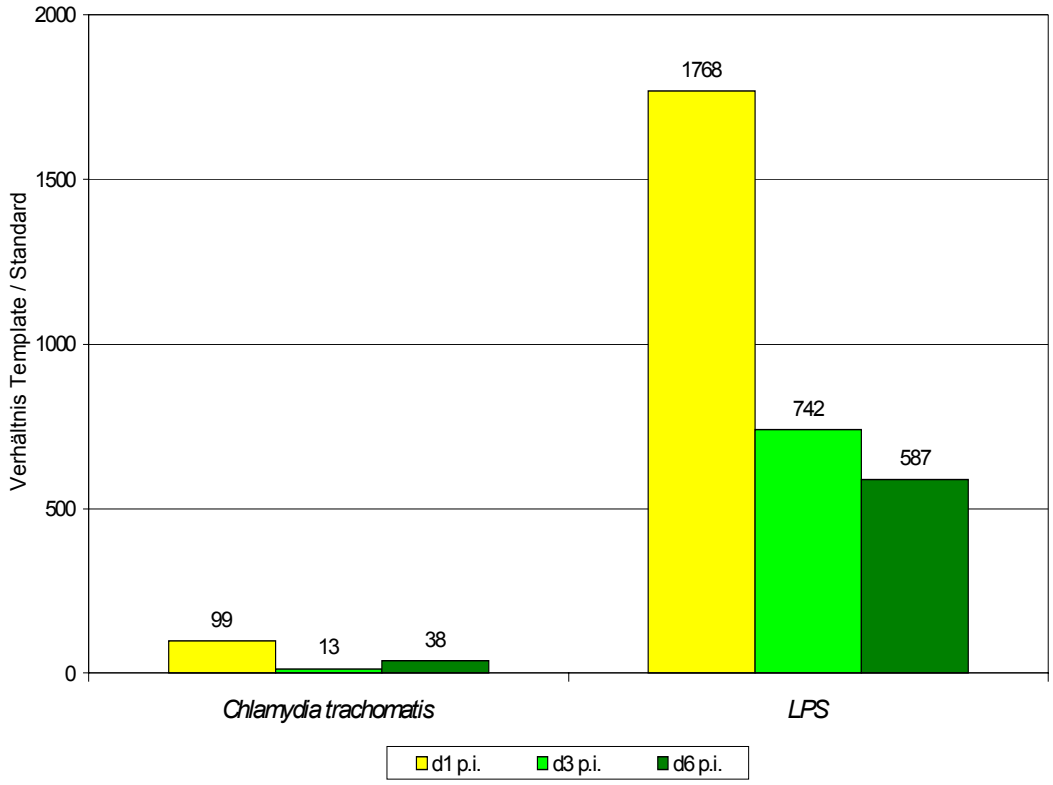

Abb. 38: Expression des cox-2-Gens in *CT*-infizierten/LPS-stimulierten HPBM.
CT (MOI 5) infizierte, bzw. LPS-stimulierte HPBM wurden auf cox-2-Expression an Tag 1, 3 und 6 nach Infektion/Stimulation untersucht. Die Daten geben den Gehalt an cox-2-mRNA relativ zur RPS9-housekeeping-mRNA an (1 Experiment).

5.3.4 Zytokinproduktion von CT-infizierten HPBM

HPBM aus peripherem Blut von drei Probanden wurden mit *C. trachomatis* (MOI 1) infiziert und 4 Tage lang kultiviert. Fünf Proben wurden an Tag 1 entnommen (nach 2, 4, 6, 10 und 24 h p.i.) und an den darauf folgenden Tagen jeweils eine Probe (d2, d3 und d4). Diese wurden auf die Zytokine IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p75, IFNγ und TNFα untersucht.Die Zytokin-Produktion im Zeitverlauf ist für drei Blutspender in Abb. 39 dargestellt.

Die gebildeten Zytokine und deren Mengen unterschieden sich bei den einzelnen Probanden. Die HPBM aller drei Probanden bildeten aber das Zytokin IL-10 während der ersten 3 – 4 Tage nach Infektion. Bei HPBM von zwei Probanden (A und C) ähnelte sich das Muster bezüglich der Zytokine auch hinsichtlich der TNF und IL-6-Produktion. Proband A und B bildeten IL-1β. Sehr geringe Mengen IL-4 wurden von Proband A und geringe IFNγ-Mengen nur von Proband B gebildet.

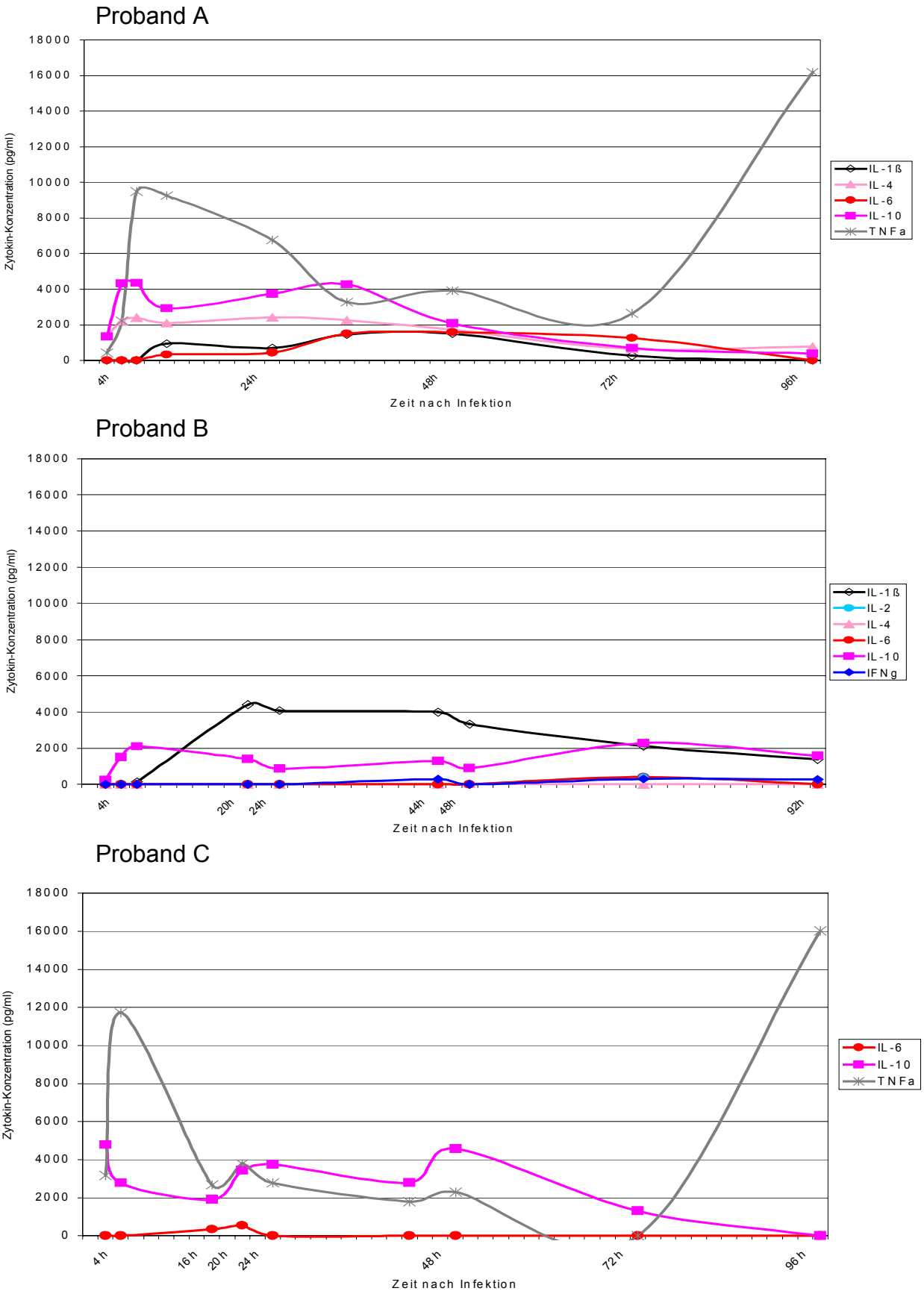

Abb 39: Zytokinproduktion *CT*-infizierter HPBM während der ersten 4 Tage nach der Infektion

HPBM von 3 Probanden wurden mit *CT* (MOI 1) infiziert. Innerhalb der ersten vier Tage nach der Infektion wurden Proben des Überstandes entnommen und auf gebildete Zytokine untersucht.

Zusammenfassend lässt sich eine überwiegende Produktion von TH-2-Zytokinen feststellen. Zusätzlich bildeten die HPBM aller Probanden entweder IL1β oder/und TNFα. In Tab. 3 ist die Verteilung der gebildeten Zytokine zusammengefasst.

Tabelle 3: Synthetisierte Zytokine *CT*-infizierter HPBM während der ersten 4 Tage nach der Infektion.
(Die Mengen der gebildeten Zyokine wurden relativ zueinander in 4 Abstufungen dargestellt. – keine Produktion; (+) sehr geringe; + geringe; ++ mittlere und +++ hohe Syntheseraten.)

			TH-2-Zytokine			Th1-Zytokine		
	IL1β	**TNFα**	**IL-4**	**IL-6**	**IL-10**	**IL-2**	**IL-12p75**	**IFNγ**
Proband A	**+**	**+++**	**+**	**+**	**++**	**-**	**-**	**-**
Proband B	**+++**	**-**	**(+)**	**(+)**	**++**	**(+)**	**-**	**+**
Proband C	**-**	**+++**	**-**	**(+)**	**++**	**-**	**-**	**-**

6 Diskussion

6.1 Teil I: Mycoplasmen-Kontamination von Chlamydien-Stämmen

6.1.1 Häufigkeit mycoplasmaler Kontamination von Chlamydien-Stämmen

Mycoplasmale Kontaminationen von *Chlamydophila pneumoniae*-Stämmen sind in der Literatur wiederholt beschrieben worden (MESSMER et al., 1994; HUNICHE et al., 1998). Die Anzahl der jeweils untersuchten Stämme war jedoch gering (8-10 *CP*-Stämme) und es wurden bisher keine *Chlamydia trachomatis*-Stämme untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 26 Chlamydien-Stämme (9 *CT*- und 17 *CP*-Isolate) aus verschiedenen Quellen auf mycoplasmale Kontamination untersucht und die Rate der mit Mycoplasmen kontaminierten Stämme bestimmt. Dazu wurde eine Multiplex-PCR verwendet, mit der 15 zellkulturrelevante Mycoplasmen-Arten, inklusive der meisten humanpathogenen Spezies detektiert werden können (WIRTH et al., 1994). Im Vergleich zu Kulturmethoden ist die PCR sehr viel sensitiver in der Detektion von Mycoplasmen (NISSEN et al., 1996; WIRTH et al. 1994).
Die Zielsequenzen der Primer der verwendeten Mycoplasmen-PCR liegen im 16S rRNA-Gen. Aufgrund von Ähnlichkeiten zu den entsprechenden chlamydialen Genen ist eine Kreuzreaktivität insbesondere bei hohen Konzentrationen chlamydialer DNA zu erwarten. Entsprechend wurde eine Methode zur Differenzierung amplifizierter chlamydialer und mycoplasmaler DNA entwickelt. Durch einen *Hpa*I-Verdau der outer- oder nested-Produkte konnte aufgrund verschiedener Schnittstellen zwischen chlamydialen und mycoplasmalen Amplifikaten unterschieden werden. Zusammen mit der Breitspektrum-PCR ergab sich so eine hochsensitive und spezifische Methode zur Detektion verschiedener Mycoplasmen-Spezies. Das Ergebnis wurde in ausgewählten Proben durch Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt und die Spezies bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Mycoplasmenkontamination chlamydialer Stämme ergaben eine bemerkenswerte Zahl mycoplasmenkontaminierter Chlamydienstämme. 55% (5/9) der *CT*- und 35% (6/17) der *CP*-Stämme aus unterschiedlichen Quellen waren durch verschiedene Mycoplasmenarten kontaminiert. Dieses Ergebnis korrespondiert mit der hohen Zahl von

Kontaminationen, die durch HUNICHE et al., 1998 (5/8) und MESSMER et al., 1994 (3/10) beschrieben wurden und bestätigt die Relevanz des Problems.

Im Hinblick auf die möglichen Ursachen der Kontaminationen sind zwei sich nicht notwendigerweise ausschließende Erklärungen möglich. Erstens ist eine Ko-Kultivierung von Chlamydien und Mycoplasmen aus ursprünglich ko-infizierten klinischen Proben möglich und zweitens können während der Kulturphase der Chlamydien in Zellkulturen Mycoplasmen durch die Handhabung, fötales Kälberserum oder Trypsin in die Kulturen gelangen.

M. hyorhinis, das einen *CP*-Stamm kontaminierte ist eine bekannte Zellkulturkontaminante, so dass dieser Mycoplasmen-Stamm als Verunreinigung während der Zellkultur aufzufassen ist. *M. fermentans* (eine Kontaminante von *CT* Ser. K) ist ebenfalls eine häufige Kontaminante in Zellkulturen, kommt aber auch im menschlichen Genitaltrakt vor und wurde häufig gemeinsam mit *CT* isoliert (MATHUR et al., 1985, SAMRA et al., 1994). Sowohl eine Ko-Kultivierung, als auch eine nachträgliche Kontamination während der Anzucht in Zellkulturen wäre deshalb für *M. fermentans* denkbar. *M. hominis* (Kontaminante in *CT* Ser. A, D und K) ist eine sehr seltene Zellkulturkontaminante (BARILE, 1973; BÖLSKE, 1988; HAY et al., 1989). Es kommt aber häufig im menschlichen Urogenitaltrakt vor und ist deshalb vermutlich Folge einer gleichzeitigen Isolierung mit *CT* (BARILE & DELGUIDICE, 1972; SAMRA et al., 1994).

6.1.2 Biologische Effekte von Mycoplasmen auf chlamydiale Infektionen in vitro

Mycoplasmen verursachen im Gegensatz zu Pilzen und anderen Bakterien keine Medientrübung durch Massenwachstum, selbst wenn Zellzahlen von 10^8/ml erreicht werden. Sie bleiben dementsprechend häufig unentdeckt. Dennoch können Mycoplasmeninfektionen gravierende Auswirkungen auf Zellkulturen und alle damit einhergehenden experimentellen Ergebnisse haben. Mycoplasmen sind in der Lage nahezu alle physiologischen und biochemischen Parameter einer Zellkultur zu verändern: Starke Veränderungen des Kulturmilieus, Hemmung der Zellmitosen, Induktion von Chromosomenbrüchen, Lyse, bzw. Transformation der Zellen, Inhibition der Produktion von biologischen Produkten (z. B. Zytokine, Interferone), Hemmung von Virusanzuchten, Interferenz mit den verschiedensten biologischen Assays, etc. (LANG, 1985; BARILE & Mc GARRITY, 1993).

Ein supprimierender Effekt von *M. hyorhinis* auf das Wachstums von *C. psittaci* wurde von VAN NEROM et al., 2000 beschrieben. Ob Mycoplasmen auch das biologische Verhaltens von *C. trachomatis* oder *C. pneumoniae* verändern, war bisher unbekannt.
In dieser Arbeit wurden *CP*-Infektionen in Anwesenheit von Mycoplasmen (*M. fermentans* und *M. hyorhinis*) mit mycoplasmenfreien *CP*-Infektionen verglichen. Mit ansteigender Mycoplasmen-Zahl im Medium verringerten sich Anzahl und Größe der *CP*-Einschlusskörper bis hin zur vollständigen Suppression der chlamydialen Entwicklung.
In anderen Versuchen mit *Chlamydia trachomatis* wurde beobachtet, dass mycoplasmenfreie Elementarkörper gegenüber einer mit *M. fermentans* kontaminierten *CT*-Präparation im Immunoperoxydase-Assay eine um den Faktor 10 höhere Infektiösität aufweisen (Daten aus der Promotionsarbeit von Petra Dollmann).

Der Mechanismus der durch Mycoplasmen induzierten Suppression der chlamydialen Entwicklung bzw. ihrer Infektiösität ist unbekannt. Mycoplasmen könnten die Oberfläche der Wirtszellen blockieren und die Chlamydien an der Infektion hindern, oder sie beeinflussen den Entwicklungszyklus der Chlamydien, indem sie z.B. um bestimmte Nahrungsbestandteile konkurrieren (FOGH, 1973). Weiterhin könnten die Mycoplasmen zytopathisch auf die Wirtszellen wirken und damit indirekt auch die Entwicklung der Chlamydien hemmen (RAZIN et al., 1998). In den eigenen Versuchen waren jedoch keine Auswirkungen auf die Vitalität der mit Mycoplasmen infizierten versus nicht-infizierten Zellen zu beobachten.

Auch *in vivo* sind für Mycoplasmen eine ganze Reihe von Auswirkungen auf das Wirts-Immunsystem beschrieben worden. So üben Mycoplasmen diverse unspezifische immunmodulatorische Effekte auf Zellen des Immunsystems aus. Sie können B- und T-Lymphozyten entweder supprimieren oder polyklonal stimulieren, Zytokine induzieren, die Zytotoxizität von Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen erhöhen, die Expression von Zell-Rezeptoren anregen und die Komplementkaskade aktivieren (zusammengefasst in RAZIN et al., 1998).

In den eigenen Arbeiten zur Induktion der Prostaglandin E_2-Synthese in Monozyten konnte eine mycoplasmeninduzierte PGE_2-Synthese demonstriert werden (siehe 5.3.3.1)
Mycoplasmen-Kontaminationen von Chlamydien-Stämmen stellen also auch in dieser Hinsicht ein relevantes Problem dar.

6.1.3 Eradikation von Mycoplasmen aus Chamydien-Stämmen

Die Kontamination mit Mycoplasmen stellt auch ein häufiges Problem in Zellkulturen dar. Entsprechend liegen verschiedene Protokolle zur Abtötung von Mycoplasmen in Zellkulturen vor (zusammengefasst in HAY et al., 1989). Die Antibiotika, die in diesen Anweisungen empfohlen werden, z.B. Tetracyclin und der Gyrase-Hemmer Ciprofloxacin hemmen jedoch nicht nur Mycoplasmen, sondern auch Chlamydien.
Ein anderer Ansatz zur Dekontamination chlamydialer Stämme von Mycoplasmen ist die intraperitoneale Passage in Mäusen. Obwohl diese Methode für die ebenfalls intrazellulär lebenden Rickettsien zur Mycoplasmen-Dekontamination beschrieben wurde (EREMEEVA et al., 1994), waren ähnliche Dekontamiations-Versuche von Hybridoma-Zellen in Mäusen nicht in allen Fällen erfolgreich (CAROLL & O´KENNEDY, 1988; RAVAOARINORO & LECOMTE, 1988). Weiterhin wurde die spezielle Empfindlichkeit der mycoplasmalen Zellmembran gegen das Detergenz Triton X-100 eingesetzt. Im Gegensatz zu Chlamydien besitzen Mycoplasmen keine Zellwände und sind dementsprechend sensitiv gegenüber organischen Lösungsmitteln oder osmotischem Schock. Es reagierten aber auch einige *Chlamydophila pneumoniae* Isolate empfindlich auf die Triton X-100-Behandlung (OSSEWARDE et al., 1996).
Die Suche nach einem selektiv mycoplasmaciden Antibiotikum ohne antichlamydiale Wirksamkeit stellte deshalb einen neuen Ansatz zur Mycoplasmen-Eradikation aus Chlamydien-Kulturen dar. Diesen Anforderungen entsprach das Antibiotikum Mupirocin (HANNAN, 1998; WARD & CAMPOLI-RICHARDS, 1986). Diese, auch „Pseudomonas-Säure-A“ genannte Verbindung ist eine der Hauptsubstanzen mit antibakterieller Wirksamkeit von *Pseudomonas fluorescens*. Mupirocin dringt über passive Diffusion in die Bakterien ein und bindet im Inneren der Zellen an die bakterielle Isoleucyl-t-RNA-Synthetase, wodurch eine Blockade der Protein- und RNA-Synthese erfolgt (WARD & CAMPOLI-RICHARDS, 1986). Mupirocin übt eine bacterizide Wirkung auf Mycoplasmen aus, ohne die Zellen oder Chlamydien in der

Kultur zu beeinträchtigen (HANNAN, 1995; WARD & CAMPOLI-RICHARDS, 1986). Wichtig ist bei einer Mupirocin-Behandlung das Verwenden serumfreien Kulturmediums, da das Antibiotikum durch Serum gebunden wird und an Aktivität verliert (WARD & CAMPOLI-RICHARDS, 1986).

Ein klinisches Isolat von *Chlamydophila pneumoniae* wurde mit Hilfe der hier entwickelten, 15 Tage währenden Mupirocin-Behandlung gereinigt.
Die erfolgreiche Elimination von Mycoplasmen-DNA aus Chlamydien-Kulturen wurde durch die mycoplasmenspezifische PCR bestätigt. Da die PCR eine hochsensitive Nachweismethode für geringe DNA-Mengen ist, birgt sie den Nachteil, nicht nur lebende, sondern auch tote Erreger zu detektieren, da die DNA abgestorbener Erreger noch für eine geraume Zeit im Medium bleibt. Dieser Tatsache wurde durch weitere Aufreinigungsschritte und Subkultur Rechnung getragen. Sowohl nach der Isolation hochkonzentrierter chlamydialer Elementarkörperchen als auch nach der Kultur in HEp-2-Zellen ohne Zusatz von Antibiotika war keine Mycoplasmen-DNA mittels PCR mehr nachweisbar. (KRAUSSE-OPATZ et al., 2000)
Eine erfolgreiche Elimination von *M.fermentans* aus einem *CT* Ser. K-Stamm gelang mit der beschriebenen Methode ebenfalls (im Rahmen der Promotionsarbeit von P. Dollmann).

Zusammenfassend wird das biologische Verhalten einer Chlamydieninfektion *in vitro* deutlich durch Mycoplasmen beeinflusst. Bei Studien zur Wirts-Chlamydien-Interaktion, beispielsweise bei der Untersuchung der Zytokin- oder Prostaglandin-Synthese durch Monozyten/Makrophagen ist es deshalb essentiell, mycoplasmenfreie Chlamydien zu verwenden. Andernfalls können die beobachteten Effekte nicht zweifelsfrei den Chlamydien zugeschrieben werden. Wenn klinische Isolate aufgrund von Koinfektionen mycoplasmenkontaminiert sind, bietet die neu entwickelte Mupirocin-Behandlung erstmals die Möglichkeit, selektiv Mycoplasmen aus Chlamydienkulturen zu entfernen.

6.2 Teil II: Mechanismen der chlamydialen Persistenz in THP-1 und HEp-2-Zellen

Eine persistierende chlamydiale Infektion ist eine stabile Wirts-Chlamydien-Interaktion, die ein längeres Überleben des Erregers in der Wirtszelle erlaubt. *Chlamydia trachomatis* persistiert im Gelenk v.a. in Monozyten, aber auch in Fibroblasten. Weiterhin gibt es gute Evidenzen, dass *Chlamydia trachomatis* durch Monozyten von der urogenitalen Eintrittspforte in das Gelenk disseminiert wird (KUIPERS et al., 1998). Chlamydien-infizierte Monozyten gelten damit als hauptverantwortlich für Entstehung und Aufrechterhaltung der Chlamydien-induzierten Arthritis (SCHUMACHER et al, 1988). Der Persistenz von *C. trachomatis* in Monozyten kommt damit eine wichtige Rolle in der Pathogenese chronischer chlamydialer Erkrankungen zu.
Im persistierenden Zustand sind Chlamydien nicht durch Antibiotika eliminierbar. Im Gegenteil, Antibiotika induzieren und erhalten sogar die Persistenz (Dreses-Werringloer et al., 2000). Ein genaueres Verständnis der Chlamydien-Monozyten-Interaktion während der Persistenz ist Grundlage für eine mögliche Beeinflussung des Persistenzgeschehens und könnte ein vielversprechender Ansatz zur Eradikation der Erreger aus dem menschlichen Körper sein.

Als auslösende Faktoren der Persistenz in epithelialen und fibroblastären Zelllinien *in vitro* sind Interferon-γ und Tumornekrosefaktor-α beschrieben (BEATTY et al., 1994a; SHEMER & SAROV, 1985; SHEMER-AVNI et al., 1989). Es kommt zu einer von der IFNγ-Konzentration abhängigen Verlangsamung des chlamydialen Entwicklungszyklus, die in einer Reifungshemmung der Retikularkörper resultiert. Der anti-chlamydiale Effekt von IFNγ und TNFα wird auf die Induktion der Indoldiamin-Oxygenase, dem Schlüsselenzym der Tryptophan-Degradation zurückgeführt (BEATTY et al.,1993; BEATTY et al., 1994a; SHEMER-AVNI et al., 1989). Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure für das chlamydiale Wachstum (COLES et al., 1993). Fehlt sie, wird die Entwicklung der Chlamydien unterbrochen. Entsprechend kann der anti-chlamydiale Effekt von IFNγ durch Zugabe von Tryptophan sowie durch Antikörper gegen IFNγ aufgehoben werden (BEATTY et al., 1994b, c).
In humanen peripheren Blutmonozyten (HPBM) waren die Zugabe von Tryptophan, sowie Antikörper gegen IFNγ oder TNFα unwirksam; die bekannten Mechanismen

der Wachstumsinhibition sind entsprechend nicht einfach auf die chlamydiale Persistenz in Monozyten übertragbar (KÖHLER et al., 1997). Es muss deshalb in Monozyten zumindest ein weiteres Effektorsystem zur Suppression des chlamydialen Wachstums existieren. Welche Faktoren und Stoffwechselwege für die chlamydiale Persistenz in Monozyten verantwortlich sind, wurde bislang noch nicht näher untersucht.

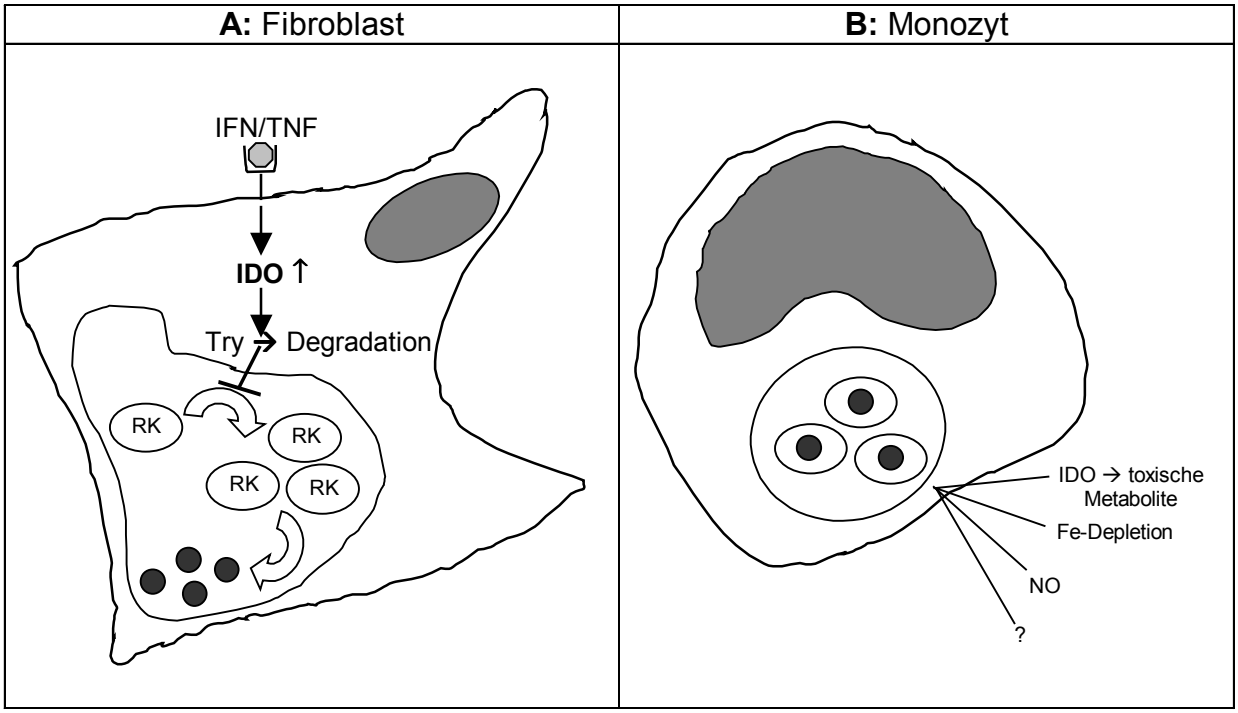

Abb. 40: Persistenz von *Chlamydia trachomatis* in Fibroblasten und Monozyten
A: Induktion der Persistenz von Chlamydia trachomatis in Fibroblasten (IFN = Interferon-γ; TNF = Tumor Nekrose Faktor-α; IDO = Indoleamin-2,3-dioxygenase; Try = Tryptophan; RK = Retikularkörper), **B:** Persistierende Infektion von *Chlamydia trachomatis* in Monozyten (N = Nukleus; Fe = Eisenionen; NO = Stickstoffmonoxid)

In der Literatur werden verschiedene Persistenz-Mechanismen diskutiert (Abb. 40). Dazu zählen weitere Produkte des IDO-abhängigen Tryptophan-Stoffwechsels, die die intrazelluläre Erregerreplikation hemmen, eine Verminderung der verfügbaren Eisen-Konzentration und die Synthese von Stickstoffmonoxid. Die für andere intrazelluläre Erreger beschriebenen Mechanismen sind in Tab. 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Persistenzinduzierende Mechanismen bei verschiedenen intrazellulären Erregern
(MDM = aus Monozyten generierte Makrophagen; Trp = Tryptophan; NO = Stickstoffmonoxid; Fe = Eisen-Ionen)

Mikroorganismus	Zellen	Mechanismus	Autoren
Legionella pneumophila	Monozyten	Regulation der Transferrin-Rezeptoren	BYRD & HORWITZ, 2000
Ehrlichia chaffensis	Monozyten/THP-1	Eisendepletion	BARNEWALL & RIKIHISA, 1994
Toxoplasma gondii	Humane Fibroblasten	Trp-Degradation	PFEFFERKORN et al., 1984
	Glioma Zellen	Trp-Degradation	DÄUBENER et al., 1993
	Primäre Enterozyten	Eisendepletion	DIMIER & BOUT (1998)
	Murine aktivierte Makrophagen	NO-Synthese	ADAMS et al., 1990
	Humane MDM	Kein Fe-Effekt	MURRAY et al., 1991
Cryptosporidium parvum	Enterozyten	1. Invasionshemmung 2. Eisen-Effekt	POLLOK et al., 2001

Als Modellsystem für Monozyten wurde in den vorgelegten Untersuchungen die Zelllinie THP-1 ausgewählt, eine promonozytäre Vorläuferzelllinie, die wie Monozyten und Makrophagen den Oberflächenmarker CD14 exprimiert und mit TPA zu einem makrophagenähnlichen adhärenten Stadium differenzierbar ist (TSUCHIYA et al., 1980). Weiterhin ist in THP-1-Zellen das Enzym Indoleamin-2,3-dioxygenase induzierbar. Diese Eigenschaften machen THP-1-Zellen als Untersuchungsobjekt für die chlamydiale Persistenz in Monozyten geeignet.
Die epitheliale Zelllinie HEp-2 wurde zum Vergleich mit THP-1-Zellen mitgeführt. Auf diese Weise sollten mögliche Unterschiede in der Persistenz von Chlamydien in monozytären und epithelialen Zelllinien erkannt werden.

6.2.1 Wirkung von IFNγ und Fe^{2+}-Ionen

In mit Chlamydien infizierten HEp-2-Zellen kommt es durch eine Behandlung mit IFNγ zu einer dosisabhängigen Reduktion von Zahl und Größe der chlamydialen Einschlusskörper bis hin zur vollständigen Suppression der EK-Bildung. In THP-1-Zellen hemmt IFNγ ebenfalls die Entwicklung der Einschlusskörper. Diese Hemmung ist von der Konzentration und der Dauer der Vorinkubation abhängig. Da die chlamydiale Entwicklung nicht vollständig unterbrochen wurde, können in diesem System das chlamydiale Wachstum modulierende Effekte anderer Wirkstoffe

untersucht werden. Die Bestimmung von Anzahl und Größe der EK sind gut messbare Größen, die die Wirkung von IFNγ quantifizierbar machen.
Zunächst wurde der Einfluss freier Eisenionen auf die durch IFNγ induzierte Entwicklungshemmung von *CT* in HEp-2- und THP-1-Zellen untersucht.

Die IFNγ-induzierte Hemmung der EK-Entwicklung wird in HEp-2-Zellen durch freie Fe^{2+}-Ionen zu 100% aufgehoben. In THP-1-Zellen ist die Suppression chlamydialer EK durch niedrigere IFNγ-Konzentrationen (5 ng/ml) ebenfalls vollständig reversibel. Die Wirkung höherer IFNγ-Konzentrationen (50 ng/ml) wird dagegen nur partiell durch Fe^{2+}-Ionen aufgehoben.
Weiterhin ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Wirkung von IFNγ und der verwendeten FCS-Konzentration des Mediums feststellen. Je mehr FCS im Medium vorhanden ist, desto schwächer ist der inhibitorische Effekt von IFNγ. Komponenten des Serums heben also ebenfalls teilweise die IFNγ-Wirkung auf.

Eine Erklärung für die Wirkung von Eisenionen stellt die durch IFNγ reduzierte Expression von Transferrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche dar (TAETLE & HONEYSETT, 1988; BYRD & HORWITZ, 1989). Über Transferrin-Rezeptoren gelangen an Transferrin gebundene Eisenionen in die Zelle (Abb. 41), die für die chlamydiale Entwicklung notwendig sind. Es ist denkbar, dass durch zusätzliche freie Eisenionen im extrazellulärem Raum der Effekt einer durch IFNγ verringerten Transferrin-Rezeptor vermittelten Eisenaufnahme aufgehoben wird. Die wachstumsfördernde Wirkung höherer FCS-Konzentrationen im IFNγ-Persistenzmodell könnte in diesem Sinne durch die im FCS vorhandenen Transferrin-Moleküle ebenfalls die IFNγ-induzierte Transferrin-Rezeptor-Reduktion partiell kompensieren. Dies wurde auch in Versuchen zum Eisenstoffwechsel von *Toxoplasma gondii* in primären Ratten-Enterozyten belegt (DIMIER & BOUT, 1998).

IFNγ würde somit über die Verringerung der Transferrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine Eisen-Mangelversorgung der Zelle und der darin befindlichen Chlamydien mit konsekutiver Wachstumsinhibition der Chlamydien verursachen.

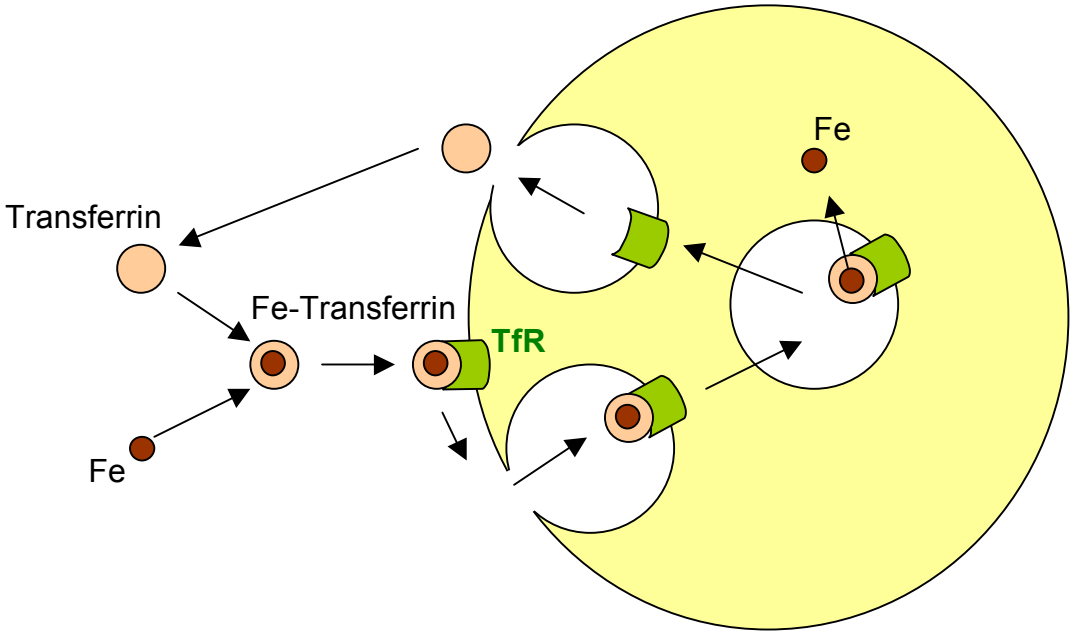

Abb. 41: Aufnahme von Eisen in die Zelle
Eisenionen werden außerhalb der Zelle an Transferrin gebunden. Fe-Transferrin bindet an den Transferrin-Rezeptor (TfR) auf der Zelloberfläche und wird durch Endocytose-Vesikel in die Zelle geschleust. Innerhalb der Zelle werden die Eisen-Ionen frei und verlassen die Vesikel. Der Transferrin-Rezeptor gelangt anschließend wieder an die Zelloberfläche und entlässt das Transferrin in den extrazellulären Raum.

Weitere Untersuchungen sollten deshalb den Einfluss der Eisendepletion im Medium durch den Zusatz des Chelatbildners Deferoxamin (DFO) prüfen.
Durch Deferoxamin (DFO) im Medium werden Fe^{3+}-Ionen äußerst fest gebunden. Ein Molekül DFO bindet dabei ein Fe^{3+}-Ion. DFO kann aber nur extrazelluläre Eisenionen binden, da es nicht in die Zelle eindringt. Es wird zwar durch Pinozytose-Prozesse bis in die Lysosomen der Zellen aufgenommen, doch bleiben die cytosolischen Eisen-Reservoire hiervon unberührt (LLOYD et al., 1991; CABLE & LLOYD, 1999)

In den eigenen Experimenten zur DFO-vermittelten Eisendepletion aus dem Medium wurde eine Abnahme der Einschlusskörper bei zunehmender DFO-Konzentration sowohl in HEp-2-, als auch in THP-1-Zellen beobachtet. Bei gleichzeitiger Behandlung mit DFO und IFNγ zeigte sich eine additive Wirkung beider Substanzen. Die Ergebnisse korrespondieren mit den Beobachtungen anderer Autoren. BARNEWALL et al. beobachteten eine Wachstumsinhibition von *Ehrlichia chaffensis* nach einem DFO-bedingten Eisenentzug im Medium von THP-1-Zellen (BARNEWALL et al., 1994). Die unmittelbare Abhängigkeit der chlamydialen Entwicklung vom Eisengehalt des Mediums wurde auch von anderen Autoren beschrieben (AL-YOUNES et al., 2001; RAULSTON, 1997).

Diese Zusammenhänge bestätigen die Bedeutung von Eisen für die chlamydiale Entwicklung. Sowohl der direkte Eisen-Entzug, als auch die indirekte Wirkung von IFNγ über eine Reduktion der Transferrin-Rezeptoren wirken sich deshalb hemmend auf die chlamydiale Entwicklung aus.

Durch den Einsatz höherer DFO-Konzentrationen (ab 100 µM) kommt es in eigenen Untersuchungen zum Absterben eines Teils der Zellen. Dieses Phänomen wurde auch von MURRAY et al., 1991 und BYRD & HORWITZ, 1989 beschrieben. Vermutlich wird dann die kritische Eisen-Ionen-Konzentration, die die Zellen zum Leben benötigen, unterschritten. Da die Entwicklung chlamydialer Einschlusskörper von der Vitalität und Stoffwechselaktivität der Wirtszelle abhängig ist, wird die Entwicklung von EK ab 100 µM DFO fast vollständig unterbrochen. FUKUCHI et al. beschrieben eine DFO-induzierte Apoptose in HL-60 Zellen (FUKUCHI et al., 1994). Möglicherweise sind DFO-induzierte Apoptose-Mechanismen auch in THP-1- und HEp-2-Zellen relevant.

Da theoretisch DFO auch unabhängig von der Eisenbindung unspezifisch die chlamydiale Entwicklung hemmen könnte, wurde weiterhin untersucht, ob sich die Eisendepletion durch DFO durch die Zufuhr freier Fe^{2+}-Ionen aufheben lässt. Bei gleichzeitiger Vorinkubation von Fe^{2+}-Ionen und DFO wird die Wirkung von DFO in HEp-2-Zellen bei allen verwendeten IFNγ-Konzentrationen komplett aufgehoben. In THP-1-Zellen dagegen sind maximal 65% der DFO-induzierten Entwicklungshemmung der Chlamydien durch Fe^{2+}-Ionen reversibel. Unklar bleibt, warum bei THP-1-Zellen im Gegensatz zu HEp-2-Zellen keine komplette Aufhebung des DFO-Effektes möglich ist. Vermutlich hat DFO auf THP-1-Zellen noch andere Wirkungen als die bisher beschriebenen.

6.2.2 Bedeutung des Tryptophan-Stoffwechsels

Die IFNγ-induzierte Induktion der Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO) wird als Ursache für die Wachstumsinhibition von intrazellulären Erregern beschrieben (BEATTY et al.,1993; BEATTY et al., 1994a; SHEMER-AVNI et al., 1989), da die IDO den Abbau der für die Entwicklung der Chlamydien essentiellen Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin bewirkt (siehe Abb. 42). Dies ist der einleitende Schritt des Tryptophan-Abbaus in der Zelle.

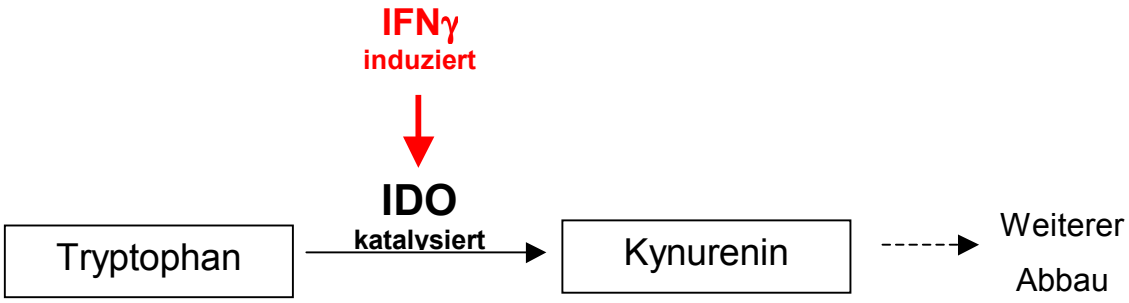

Abb. 42: Einleitender Schritt des Tryptophan-Abbaus
IFN γ induziert die Expression der Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO), die L-Tryptophan zu L-Kynurenin abgebaut. Dies ist der erste Schritt im Katabolismus von Tryptophan.

Die Tryptophandepletion stellt nach diesen Untersuchungen die Ursache für die Wachstumsinhibition der Erreger dar. Der IDO-abhängige Tryptophan-Abbau in humanen Glioblastom-Zellen und in aus Monozyten entwickelten Makrophagen kann nach McKENZIE et al. durch 6-Chloro-DL-Tryptophan (6-CDLT) gehemmt werden (McKENZIE et al., 1999).

Im THP-1- und HEp-2-System wurde die Wirkung der Erhöhung der Tryptophan-Konzentration während einer IFNγ-Behandlung untersucht.
Dabei zeigte sich, dass in *CT*-infizierten HEp-2-Zellen, die durch die Behandlung mit IFNγ nur sehr kleine Einschlusskörperchen aufweisen, Tryptophan die **Größe** der Einschlüsse wiederherstellt. Dies stützt die Hypothese, dass eine Verminderung von Tryptophan Ursache der Entwicklungshemmung von Chlamydien in IFNγ-behandelten HEp-2-Zellen ist und durch Zufuhr von Tryptophan wieder behoben wird.
IFNγ vermindert in *CT*-infizierten HEp-2-Zellen auch die **Anzahl** der Einschlusskörper. Die Wiederherstellung der ursprünglichen Anzahl chlamydialer Einschlusskörper ist durch Tryptophan nicht möglich. In IFNγ-behandelten HEp-2-Zellen vermindert sich die EK-Anzahl sogar mit steigender Tryptophan-Konzentration, während der Zusatz von Tryptophan in nicht IFNγ-behandelten HEp-2-Zellen keine Auswirkung auf Anzahl oder Größe der chlamydialen Einschlüsse hat.

In THP-1-Zellen kommt es sowohl bei IFNγ-behandelten, als auch bei nicht behandelten Zellen zu einer Reduktion der Zahl chlamydialer Einschlüsse mit

steigender Tryptophan-Konzentration. Gleichzeitig vermindert sich die Größe der chlamydialen Einschlüsse mit zunehmender Tryptophan-Konzentration. Der hemmende Effekt steigender Tryptophan-Konzentrationen auf die chlamydiale Entwicklung wird in THP-1-Zellen durch IFNγ verstärkt. Insgesamt ist der supprimierende Einfluss von Tryptophan auf Anzahl und Größe der chlamydialen Einschlüsse in THP-1-Zellen stärker als in HEp-2-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass noch andere Mechanismen des Tryptophan-Stoffwechsels, als die beschriebene Tryptophan-Depletion für die IFNγ-induzierte Reduktion der EK-Anzahl verantwortlich sind.

L-Kynurenin stellt zwar einen relativ stabilen Metaboliten, nicht jedoch das Endprodukt des Tryptophan-Abbaus dar. In weiteren Stoffwechselschritten wird es zu *3-Hydroxy-Kynurenin* und weiter zu *3-Hydroxy-Anthranilat* umgebaut, das im „normalen“ Tryptophan-Abbau über mehrere Reaktionen zu Acetoacetyl-CoA abgebaut wird.

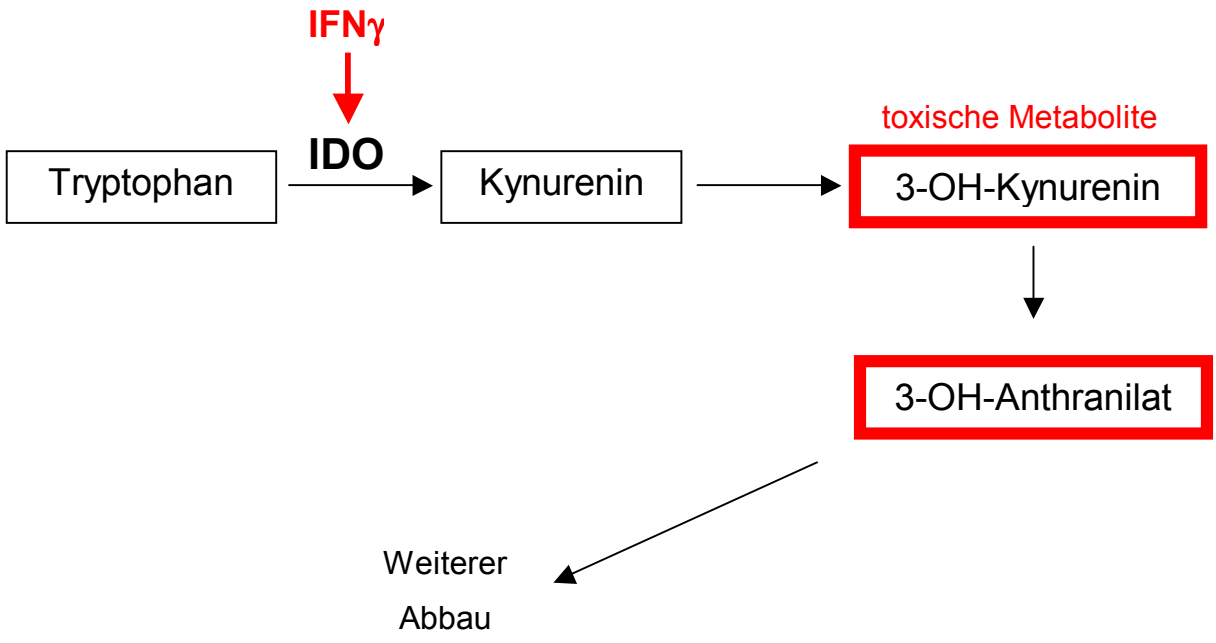

Abb. 43: Abbau von Tryptophan im Kynurenin-Stoffwechsel
Aus Kynurenin werden in weiteren Stoffwechsel-Schritten die toxischen Metabolite 3-Hydroxy-Kynurenin (3-OH-Kynurenin) und 3-Hydroxy-Anthranilat (3-OH-Anthranilat) gebildet, Intermediate des Abbau-Weges von Tryptophan.

3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilat sind in pathophysiologischen Prozessen als toxisch, bzw. Apoptose-induzierend beschrieben worden (THOMAS & STOCKER, 1999; .CHIARUGI et al., 2000; MORITA et al., 2001). Diese Zusammenhänge könnten die Ergebnisse in HEp-2-Zellen erklären.

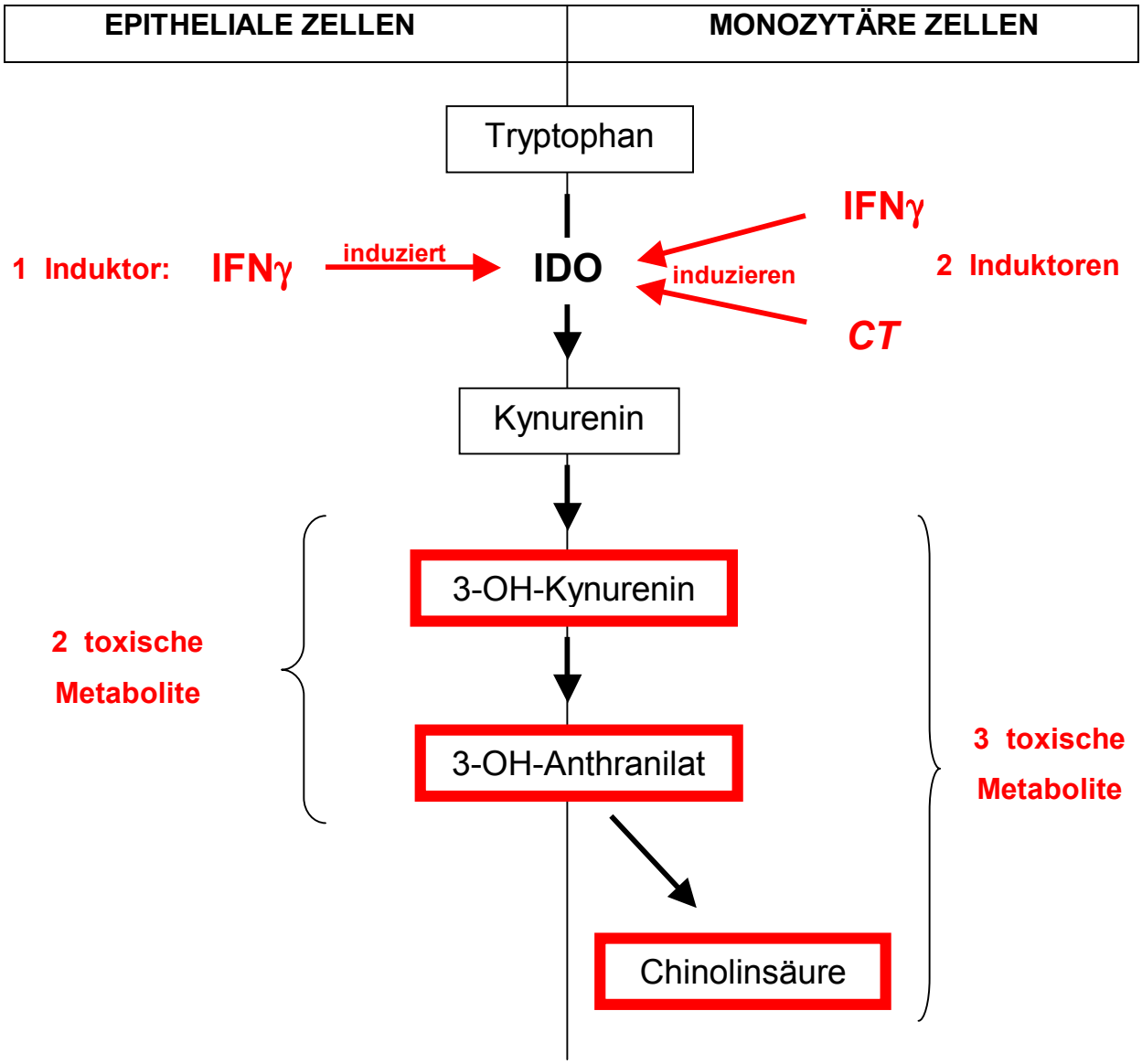

Abb. 44: Unterschiede im Kynurenin-Stoffwechsel zwischen monozytären und epithelialen Zellen.
In epithelialen Zellen wird die IDO durch IFNγ, in monozytären Zellen durch IFNγ und Chlamydien induziert. Beide Zelltypen bilden die toxischen Metabolite 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilat. Nur monozytäre Zellen sind in der Lage, aus 3-OH-Anthranilat Chinolinsäure zu bilden, so dass sie einen toxischen Metaboliten mehr als epitheliale Zellen bilden können.

Auffällig ist, dass in THP-1-Zellen die alleinige Zugabe von Tryptophan ohne IFNγ bereits zur Wachstumshemmung der Chlamydien führte und dass die zusätzliche Gabe von IFNγ diesen Effekt noch verstärkte. Diese Beobachtungen werden durch folgende Mechanismen erklärt: In THP-1-Zellen kann *CT* bereits allein die IDO

induzieren (C. BONK, Dissertation 1997), so dass es nicht der IFNγ-Vorbehandlung bedarf, um durch Tryptophan-Zufuhr toxische Metabolite zu generieren. Zusätzlich besitzen Monozyten/Makrophagen, wie THP-1-Zellen im Gegensatz zu epithelialen HEp-2-Zellen die Fähigkeit, 3-Hydroxy-Anthranilat zur ebenfalls toxischen Chinolinsäure zu metabolisieren, so dass neben den toxischen Metaboliten 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilat in THP-1-Zellen ein weiterer toxischer Metabolit generiert wird, der ebenfalls die verstärkte inhibitorische Wirkung von Tryptophan in THP-1-Zellen erklärt (SAITO et al., 1993; CHIARUGI et al., 2000; CHIARUGI et al., 2001) (vgl. Abb. 44).

Aus den beschriebenen Zusammenhängen folgt, dass eine Hemmung der IDO keine oder eine geringere Tryptophan-induzierte chlamydiale Entwicklungshemmung zur Folge haben sollte, da in diesem Fall keine (oder weniger) toxische(n) Metabolite entstehen dürften.
Deshalb wurden entsprechende Versuche mit dem IDO-Hemmer 6-Chloro-D,L-Tryptophan (6-CDLT) (McKENZIE et al., 1999) in HEp-2- und THP-1-Zellen durchgeführt.

Die in HEp-2-Zellen festgestellte IFNγ-bedingte **Verkleinerung** der chlamydialen EK konnte durch 6-CDLT schon bei der geringsten eingesetzten Konzentration komplett aufgehoben werden. Allerdings reduziert 6-CDLT die **EK-Anzahl** deutlich. Bei sehr hohen Konzentrationen (500 - 1000 µM) lösten sich zunehmend die Zellen aus den Vertiefungen der Kulturschalen ab und mittels Trypanblau-Ausschluß wurde eine Abnahme der vitalen Zellen festgestellt. 6-CDLT scheint damit eine noch stärkere Toxizität als Tryptophan aufzuweisen.
Nach McKENZIE et al. führt 6-CDLT zu einer geringeren Kynurenin-Bildung infolge Hemmung der IDO (McKENZIE et al., 1999). SAITO et al. hat jedoch gezeigt, dass 6-CDLT im Kynurenin-Weg verstoffwechselt wird (SAITO et al., 1993): 6-CDLT verdrängt L-Tryptophan am aktiven Zentrum der IDO und führt so zur Verringerung der L-Kynurenin-Bildung. Aus dem Tryptophananalogon 6-CDLT entsteht allerdings ein entsprechender Chlor-substituierter Metabolit, der möglicherweise ebenfalls zytotoxische Eigenschaften besitzt, die eventuell noch ausgeprägter, als die der Kynurenin-Abbauprodukte sind (Abb. 45). Dies könnte die stärker Chlamydien-hemmende Wirkung des 6-CDLT gegenüber Tryptophan erklären. Durch die

Verdrängung des Tryptophans durch 6-CDLT aus dem aktiven Zentrum der IDO kommt es nicht zu einer Tryptophan-Depletion. Entsprechend hebt der Zusatz von 6-CDLT die IFNγ-bedingte Verkleinerung der EK in HEp-2-Zellen auf.

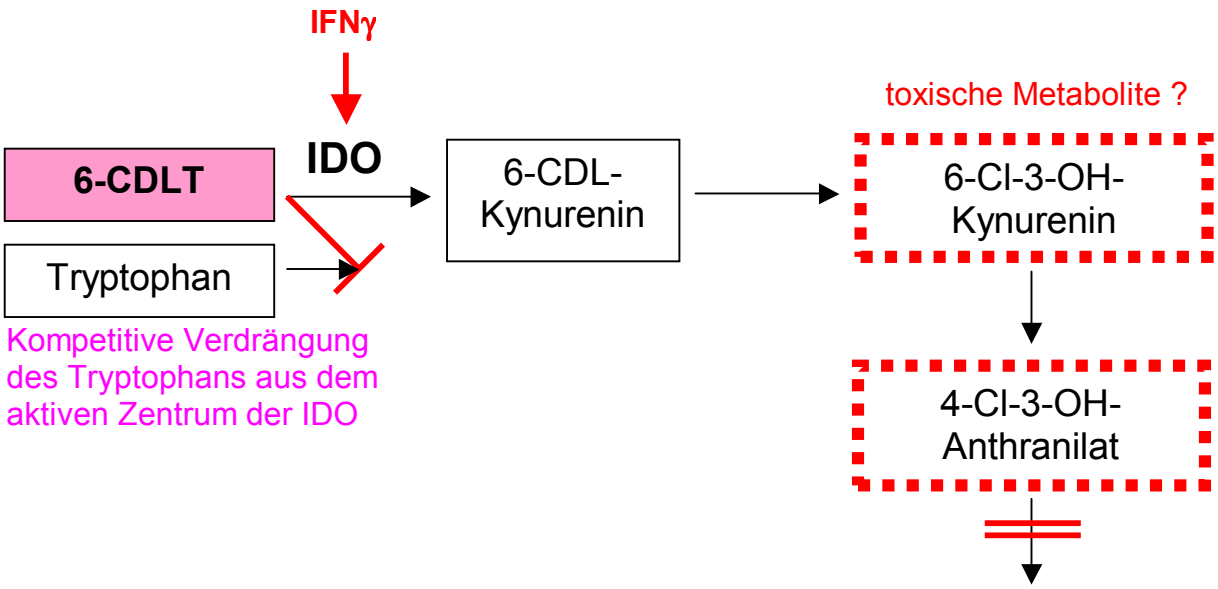

Abb. 45: Stoffwechsel von 6-CDLT.
6-Chlor-D,L-Tryptophan (6-CDLT) verdrängt Tryptophan aus dem aktiven Zentrum der IDO und wird selbst im Kynurenin-Weg verstoffwechselt. Es entstehen entsprechend chlorsubstituierte Verbindungen, die möglicherweise eine ähnliche oder stärkere Toxizität aufweisen, als die Tryptophan-Metabolite. 4-Cl-3-Oh-Anthranilat hemmt seinen weiteren Abbau und ist damit das Endprodukt dieses Stoffwechselweges.

In weiteren Versuchen müssen die beschriebenen Zusammenhänge näher untersucht werden, um Beweise für die genannten Hypothesen zu erhalten.
Ein Hemmstoff, der die IDO blockieren kann, ohne seinerseits zur Synthese toxischer Metabolite zu führen, ist dafür erforderlich. Würde unter Verwendung eines solchen IDO-Inhibitors trotz Tryptophan-Zusatz die Entwicklung der Chlamydien nicht gehemmt, wären die hier diskutierten Zusammenhänge bewiesen.

Zur Kontrolle unspezifischer toxischer Wirkungen, durch zu starke Erhöhung der Konzentration von Tryptophan im Medium, wurden exemplarisch auch zwei andere Aminosäuren, Alanin und Phenylalanin in den gleichen Konzentrationen, wie Tryptophan zu HEp-2- und THP-1-Zellen gegeben und analog die Auswirkungen auf die *CT*-Infektion untersucht.
Die Erhöhung der L-Alanin-Konzentration hat selbst bei hohen Konzentrationen (1000 µM) keinen Effekt auf die chlamydiale Entwicklung in THP-1- und HEp-2-

Zellen. L-Phenylalanin verändert die chlamydiale Entwicklung in HEp-2-Zellen nicht, jedoch supprimieren hohe Phenylalanin-Konzentrationen (1000 µM) die chlamydiale Entwicklung in nicht IFNγ-behandelten THP-1-Zellen. In IFNγ-behandelten THP-1-Zellen kommt es nur zu einer leichten nicht signifikanten Hemmung der EK-Entwicklung.
Dieser Effekt kann mit den vorhandenen Informationen bislang nicht erklärt werden und bedarf der weiteren Analyse.

6.2.3 NO-Stoffwechsel

Auch andere das chlamydiale Wachstum inhibierende Mechanismen sind in TPA-differenzierten THP-1 Zellen denkbar. MAYER und Mitarbeiter (1993) führten die Wachstumsinhibition von *Chlamydia trachomatis* in mit Interferon-γ behandelten McCoy Zellen (murine Fibroblastenzellinie) auf die Synthese von Stickoxyd zurück. Interferon-γ induziert zusammen mit einem zweiten Signal, z.B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), die Stickoxyd-Synthase (NOS). Diese katalysiert den Abbau von L-Arginin zu Stickoxyd. Aus Stickoxyd entstehen zytotoxische Stickstoffintermediate und die metabolischen Endprodukte Nitrat und Nitrit. Der anti-chlamydiale Effekt des Interferon-γ konnte entsprechend durch N-Guanidino-Monomethyl-L-Arginin (MLA), einem Hemmer der Stickoxyd-Synthase aufgehoben werden. Die Entstehung von Stickoxyd wurde auch von anderen Arbeitsgruppen für eine Interferon-γ vermittelte antibakterielle Wirkung verantwortlich gemacht. ADAMS und Mitarbeiter (1990) führten die Wachstumshemmung von *Toxoplasma gondii* in Maus-Makrophagen auf die Entstehung von Stickoxyd zurück. GREEN und Mitarbeiter (1990) zeigten, daß Stickoxyd das Wachstum von Leishmania major unterbindet. BARNEWALL (1994) und SCHNEEMANN (1993) kamen allerdings unabhängig voneinander zu der Aussage, dass in humanen Monozyten und Makrophagen im Gegensatz zu Nagetier-Monozyten und Makrophagen keine Stickoxyd-Synthase durch Interferon-γ induziert wird. Demnach ließe sich die Wachstumsinhibition von *Chlamydia trachomatis* in einem System mit humanen monozytären Zellen nicht durch die Entstehung von Stickoxyd oder zytotoxischer Stickstoffintermediate durch die Induktion der Stickoxyd-Synthase erklären.

In den eigenen Versuchen zum NO-Stoffwechsel wurden HEp-2- und THP-1-Zellen mit verschiedenen IFNγ-Konzentrationen und L-Arginin, bzw. N-Mono-Methyl-L-Arginin (L-NMMA), einem Inhibitor der NOS behandelt und mit *CT* infiziert.
Eine Erhöhung der Konzentration von Arginin, dem Substrat der NOS, sollte nach den vorgenannten Ausführungen nach NOS-Induktion eine vermehrte Produktion toxischer NO-Verbindungen und damit eine Verstärkung der IFNγ-induzierten chlamydialen Wachstumshemmung bewirken. Dies wurde jedoch in keinem der Versuchsansätze beobachtet.
Wäre eine Induktion der NOS Ursache der IFNγ-induzierten chlamydialen Entwicklungshemmung, so müsste der NOS-Hemmer L-NMMA eine Rekonstitution der chlamydialen Entwicklung bewirken. In HEp-2-Zellen und in IFNγ-behandelten THP-1-Zellen beeinflusste L-NMMA die chlamydiale Entwicklung aber nicht. In nicht IFNγ-behandelten THP-1-Zellen supprimierte L-NMMA die chlamydiale Entwicklung sogar. D-NMMA, ein bzgl. der NOS-Hemmung unwirksames Strukturanalogon von L-NMMA beeinflusste die chlamydiale Entwicklung nicht, so dass unspezifische toxische Wirkungen unwahrscheinlich sind. Der beobachtete Effekt kann daher mit den momentan vorhandenen Informationen nicht erklärt werden.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte damit kein Hinweis für die Bedeutung des NO-Stoffwechsels in mit Chlamydien infizierten epithelialen und monozytären Zellen erhoben werden – Ergebnisse, die mit denen von BARNEWALL (1994) und SCHNEEMANN (1993) übereinstimmen.

Zusammenfassend hat die verringerte **Verfügbarkeit von Eisenionen** eine besondere Relevanz für die IFNγ-bedingte Wachstumsinhibition der Chlamydien in HEp-2- und THP-1-Zellen. Durch den Zusatz freier Eisen-II-Ionen kann die IFNγ-Wirkung in HEp-2-Zellen komplett und in THP-1-Zellen teilweise aufgehoben werden.
Nach den Versuchen zum Stoffwechsel des **Tryptophans** ist ein inhibierender Effekt dieser Aminosäure auf das chlamydiale Wachstum in THP-1-Zellen etabliert. Als möglichen Mechanismus legen unsere Untersuchungen nahe, dass durch die Chlamydien- und/oder IFNγ-induzierte IDO Tryptophan zu toxischen Metaboliten abgebaut wird, die die chlamydiale Entwicklung hemmen.

Eine Beteiligung von **toxischen Stickoxid-Verbindungen** an der chlamydialen Wachstumsinhibition wurde durch die eigenen Experimente nicht bestätigt.

Abschließend seien noch die Grenzen des benutzten Infektionsmodells angemerkt. Die dem Testsystem zugrundeliegende Beurteilung der chlamydialen Einschlusskörper nach Anzahl und Größe erlaubt keinen Rückschluss auf das Entwicklungsstadium der Chlamydien. Der Anteil persistierender i.e. nicht-infektiöser Chlamydien in den Einschlusskörpern IFNγ-behandelter Zellen ist mit dem beschriebenen System nicht bestimmbar.
Der chlamydiale Entwicklungszyklus war in HEp-2- und THP-1-Zellen nicht vollständig unterbrochen, denn auch aus Zellen mit stark verkleinerten Einschlusskörpern waren noch einzelne infektiöse Chlamydien anzüchtbar.
Dies ist ein wesentlicher Unterschied zur chlamydialen Persistenz in humanen Blutmonozyten. Aus diesen können persistierende Chlamydien nicht kultiviert werden. Auch der Zusatz freier Eisenionen reaktiviert die Chlamydien in HPBMO nicht.

6.3 Teil III: Synthese von Entzündungsmediatoren in Chlamydien-infizierten humanen peripheren Blutmonozyten

CT und *CP* können chronisch-entzündliche Erkrankungen verursachen. Es gibt gute Evidenzen, daß die Persistenz der metabolisch aktiven, nicht-replikativen Erreger im betroffenen Gewebe einen entscheidenden Stimulus für die Auslösung und Unterhaltung der Entzündung darstellt. Von intrazellulären Chlamydien synthetisierte Makromoleküle (z.B. chlamydiales Hitzeschock-Protein [hsp60] und chlamydiales Lipopolysaccharid) könnten Auslöser für die Synthese von Zytokinen und Prostaglandinen sein, die die Entzündungsreaktion verursachen.
Monozyten kommt eine zentrale Rolle in der Erregerdissimination zu (KUIPERS et al., 1998). Ein genaueres Verständnis der Chlamydien-Monozyten-Interaktion stellt somit die Grundlage zum besseren Verständnis der Pathophysiologie chlamydialer Erkrankungen dar.
Bislang war noch nicht bekannt, ob Chlamydien in Monozyten die Produktion von Prostaglandinen stimulieren können.

6.3.1 Prostaglandin E_2-Sekretion während der Frühphase der persistierenden Infektion

In eigenen Experimenten wurde geprüft, ob *CT*- und *CP*-Infektionen in humanen peripheren Blut-Monozyten *in vitro* die Synthese von Prostaglandin E_2 stimulieren. Als Positivkontrolle wurde *E. coli*-LPS (10 µg/ml) verwendet, das einen starken Stimulus zur PGE_2-Synthese darstellt (LEE et al., 1992; ENDO et al., 1996). Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der PGE_2-Produktion während der ersten 10 Tage nach Infektion, bzw. durch *E. coli*-LPS-Stimulation untersucht.

Die PGE_2-Synthese findet innerhalb der ersten 3 Tage nach Infektion/Stimulation statt. Innerhalb der ersten 24 Stunden steigt die Menge des gebildeten PGE_2 steil an und sinkt bis ca. 72 Stunden nach Stimulation wieder auf den Nullwert ab. Dieser zeitliche Ablauf der PGE_2-Synthese ist bei beiden Chlamydien-Infektionen (*CT* und *CP*) vergleichbar; die Menge gebildeten PGE_2 ist nach Chlamydien-Infektionen aber deutlich geringer als nach *E. coli*-LPS-Stimulationen.

In einem weiteren Schritt wurde die *E. coli*-LPS-induzierte Prostaglandin-Synthese humaner peripherer Blutmonozyten (HPBM) einer Gruppe von 27 Blutspendern untersucht. Es wurden große individuelle Differenzen bezüglich der gebildeten PGE_2-Mengen festgestellt. Die Mengen variierten zwischen 1 ng/ml und 50 ng/ml. Nur die HPBM von 4 von 27 Probanden produzierten reproduzierbar hohe PGE_2-Mengen über 30 ng/ml. Da diese HPBM auch zur Synthese messbarer PGE_2-Mengen aufgrund chlamydialer Stimuli angeregt werden konnten, wurden sie für die weiteren Experimente benutzt.

HPBM dieser Spender wurden mit *E. coli*-LPS stimuliert und mit *CT*, *CP und/*oder *Mycoplasma fermentans* infiziert. Die jeweils gebildeten PGE_2-Mengen, die Abhängigkeit von der Stimulationsdauer sowie die MOI-Abhängigkeit der chlamydialen PGE_2-Synthese wurden untersucht.

CT (MOI 5; Chlamydien-Zell-Verhältnis 5 : 1)-infizierte HPBM bildeten PGE_2-Mengen, die maximal 80% der LPS-Kontrolle entsprachen. *CP* (MOI 5)-infizierte HPBM dagegen bildeten nur ca. 10% der *E. coli*-LPS-Kontrolle. Die durch Infektion mit *Mycoplasma fermentans* (Mycoplasmen-Zell-Verhältnis 1 : 1) induzierte PGE_2-Produktion lag bei ca. 50% der LPS-Kontrolle, obwohl nur 1/5 der Erregerzahl der Chlamydien-Infektionen vorlag. Mycoplasmen stellen demnach einen stärkeren Stimulus für die Synthese von Prostaglandin E_2 dar als Chlamydien. Dies

verdeutlicht, wie wichtig mycoplasmenfreie Chlamydien-Kulturen sind, wenn chlamydiale Eigenschaften Ziel der Untersuchungen sind (5.1.3).

Vergleicht man die verschiedenen „Induktoren“ anhand der Mengen gebildeten PGE_2, so nimmt die Stärke der PGE_2-Produktion von links nach rechts zu:

CP < CT < M. fermentans

Chlamydien sind verglichen mit *E. coli*-LPS schwächere Induktoren für die monozytäre Prostaglandin-Synthese. *CP* stellt wiederum einen schwächeren Stimulus als *CT* der gleichen MOI dar. Dass es sich dabei nicht um einen von der jeweiligen Chlamydien-Präparation abhängigen zufälligen Effekt handelt, wurde geprüft, indem verschiedene *CT* (3) und *CP* (2)-Präparationen verglichen wurden. In allen Fällen war bei gleicher MOI die PGE_2-Synthese nach *CT*-Infektion stärker als nach *CP*-Infektion.
Weiterhin waren die gebildeten Prostaglandin-Mengen von der chlamydialen MOI abhängig. Mit steigender Erregerzahl stiegen auch die gebildeten PGE_2-Mengen. Bei Koinfektionen von Chlamydien und Mycoplasmen lag ein additiver Effekt auf die Prostaglandin-Synthese vor.

PGE_2 ist im Medium stabil und reichert sich daher bis zur Ernte der Kulturüberstände an. In Versuchsansätzen, in denen die Menge des bis Tag 1 und Tag 3 nach Infektion angesammelten Prostaglandins bestimmt wurde, wurde ein Unterschied in der Zeitkinetik der PGE_2-Produktion zwischen chlamydialer und *E. coli*-LPS-abhängiger Stimulation festgestellt:
E. coli-LPS-stimulierte HPBM steigerten die produzierten Prostaglandin-Mengen zwischen Tag 1 und Tag 3 p.i. um mehr als das Doppelte der an Tag 1 synthetisierten Menge. Chlamydien-infizierte Monozyten dagegen stellten ihre PGE_2-Synthese nach Tag 1 p.i. ein.

Parallel zu den Messungen der PGE_2-Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurde die Expression der cox-2-mRNA untersucht. Diese war bei *E. coli*-LPS-stimulierten HPBM an Tag 1 p.i. ca. 1800-fach gegenüber der scheininfizierten Kontrolle erhöht. Innerhalb der nächsten Tage sank die Expression um 60 – 70% ab, lag aber immer

noch ca. 600-fach über der Kontrolle. Die ausgeprägte Expression des cox-2-Gens in *E. coli*-LPS-stimulierten Monozyten korrespondierte mit den hohen Prostaglandin-Mengen, die zu den entsprechenden Zeitpunkten in den Kulturüberständen gemessen wurden.
Die Expressionsstärke der cox-2-mRNA *CT*-infizierter (MOI 5) Monozyten lag deutlich niedriger, als die *E. coli*-LPS-stimulierter Monozyten. An Tag 1 p.i. war sie gegenüber der scheininfizierten Kontrolle um den Faktor 100 erhöht. Auch diese Expression nahm innerhalb der nächsten Tage um 60 - 90% ab und kann deshalb den chlamydieninduzierten PGE_2–Synthese-Stopp nach Tag 1 p.i. erklären. Nicht erklären lassen sich aber die im Vergleich zur nur mäßig induzierten cox-2-mRNA-Expression relativ hohen gebildeten PGE_2–Mengen: Die Expression der cox-2-mRNA in *CT*-infizierten Monozyten entsprach nur 6% der Expressionsstärke in *E. coli*-LPS-stimulierten. Trotzdem bildeten *CT*-infizierte Monozyten 60 – 80% der Menge an PGE_2, die in *E. coli*-LPS-stimulierten HPBM gebildet wurde.

Die Regulation der Expression des cox-2-Gens ist komplex und erfolgt auf mehreren Ebenen. Transkriptionale, posttranskriptionale und posttranslationale Mechanismen sind beschrieben (COK & MORRISON, 2001; TANABE & TOHANI, 2002; WU et al., 2001). *E. coli*-LPS kann die Transkription der cox-2-mRNA in humanen promonozytären U937-Zellen induzieren und die gebildete mRNA posttranskriptional stabilisieren (BARRIOS-RODILES et al., 1999). Auch PGE_2, das Hauptprodukt der Cox-2 kann die cox-2-mRNA stabilisiieren und dadurch, im Sinne einer positiven Rückkopplung eine weitere Anreicherung von PGE_2 bewirken (FAOUR et al., 2001). Die Translation unterliegt der Kontrolle verschiedener cytosolischer Proteine, die an die 3´-„untranslated region“ (UTR)- der mRNA binden und so die Proteinbiosynthese ermöglichen (SENGUPTA et al., 2003) oder verhindern (DIXON et al., 2000). Auch auf Enzymebene sind weitere Kontrollmechanismen bekannt. So kann zum Beispiel Peroxynitrit eine Aktivierung der Cox-2 bewirken (WU et al., 2001).

Mittels Real-time-RT-PCR lässt sich nur die Menge gebildeter mRNA quantifizieren. Über die Translationseffizienz und die Aktivität der gebildeten Enzyme lassen sich keine Aussagen machen.
Die genannten Zusammenhänge können die hohe PGE_2-Syntheserate in LPS-stimulierten HPBM erklären: *E. coli*-LPS wirkt transkriptional aktivierend und

posttranskriptional stabilisierend und so eine hohe PGE_2-Syntheserate bedingen. Gebildetes PGE_2 wiederum stabilisiert die cox-2-mRNA und bewirkt somit indirekt eine noch stärkere PGE_2-Synthese.
Chlamydiales LPS oder andere chlamydiale Komponenten sind schwächere Induktoren der cox-2-mRNA-Expression, als *E. coli*-LPS. Die Translationseffizienz der *CT*-induzierten cox-2-mRNA und/oder die Aktivität der Cyclooxygenase-2 muss aber gegenüber *E. coli*-LPS-stimulierten Monozyten hoch sein. Anderenfalls wären die gebildeten PGE_2-Mengen deutlich geringer gewesen.
Welche Regulations-Mechanismen der Prostaglandin-Synthese in chlamydien-infizierten Monozyten etabliert sind, müssen weitere Untersuchungen klären.

6.3.2 Zytokin-Sekretion während der Frühphase der persistierenden Infektion

HPBM von drei verschiedenen Blutspendern wurden mit *CT* (MOI 1) infiziert und 4 Tage lang kultiviert. Die Kulturüberstände wurden auf die Zytokine IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p75, IFNγ und TNFα untersucht.
Bei den HPBM-Kulturen handelte es sich um Mischkulturen aus Monozyten, T- und B-Lymphozyten. Die Zytokinantwort beinhaltete entsprechend neben den Monokinen auch Lymphokine. Das Muster der synthetisierten Zytokine war individuell verschieden. Die HPBM aller Probanden bildeten aber über den gesamten Untersuchungszeitraum IL-10, die HPBM zweier Spender produzierten auch hohe Mengen an TNFα. Insgesamt wurden von HPBM der drei untersuchten Blutspender mehr Th2-Zytokine, zusammen mit den inflammatorischen Zytokinen IL-1β und/oder TNFα gebildet. Nur HPBM eines Probanden produzierten zusätzlich geringe Mengen der Th1-Zytokine IFNγ und IL-2.

Eine adäquate Immunantwort auf eine Infektion mit intrazellulären Erregern würde die Beteiligung von Th1-Zellen mit den Zytokinen IFNγ, IL-2 und IL-12p75 erfordern. Dies fördert eine Aktivierung der zellulären Immunität und damit eine schnellere Eradikation der intrazellulären Erreger. Eine Th2-Antwort dagegen, geprägt durch die Zytokine IL-4, IL-6 und IL-10 entspricht einer Immunantwort auf extrazelluläre Bakterien mit starken Immunglobulin-Antworten (MOSMANN & COFFMAN, 1989 a, b; ROMAGNANI, 1991).

Die chlamydiale Infektion ist somit von den HPBM der drei untersuchten Probanden nicht mit einer „adäquaten Zytokin-Antwort“ auf intrazelluläre Erreger beantwortet worden. IL-10 hemmt allgemein die Zytokin-Sekretion in Th1-Zellen und ist ein Antagonist der Produktion und Funktion von IFNγ (D´ANDREA, 1993). Die Abwehr intrazellulärer Erreger wird damit ineffizienter.
Weiterhin hemmt IL-10 die Synthese der inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNFα, indem es die schnelle Degradation der entsprechenden Zytokin-mRNA´s fördert (DE WAAL MALEFYT et al., 1991).
Da nur drei Probanden untersucht wurden, kann aufgrund dieses Ergebnisses keine allgemeingültige Aussage zur biologischen Relevanz der Beobachtungen gemacht werden. Weitere Untersuchungen an HPBM eines größeren Spender-Kollektivs müssen folgen, um diese Frage zu klären.

6.4 Eisen-, Tryptophan- und Prostaglandin-Stoffwechsel - Gibt es einen Zusammenhang ?

Die in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Persistenz-Mechanismen und die während einer persistierenden Infektion gebildeten Entzündungsmediatoren werden im Folgenden in ein *hypothetisches Persistenz-Konzept* integriert.

IFNγ und Chlamydien induzieren die Expression der IDO. Gleichzeitig reduziert IFNγ die Expression des Transferrin-Rezeptors auf der Zelloberfläche. Damit wird der Transport von Eisen-Ionen in die Zelle verringert. Beim Aufbau der IDO wird Eisen in Form von Häm benötigt, wodurch auch die intrazellulären Eisenreserven reduziert werden. Insgesamt ist dadurch **weniger Eisen** in der Zelle für das chlamydiale Wachstum verfügbar.
Die Aktivität der IDO reduziert den zellulären Tryptophan-Pool und führt zur Synthese toxischer Metabolite. Sowohl die **Verarmung an Tryptophan**, als auch die **toxischen Metabolite** hemmen das chlamydiale Wachstum (Abb. 46).

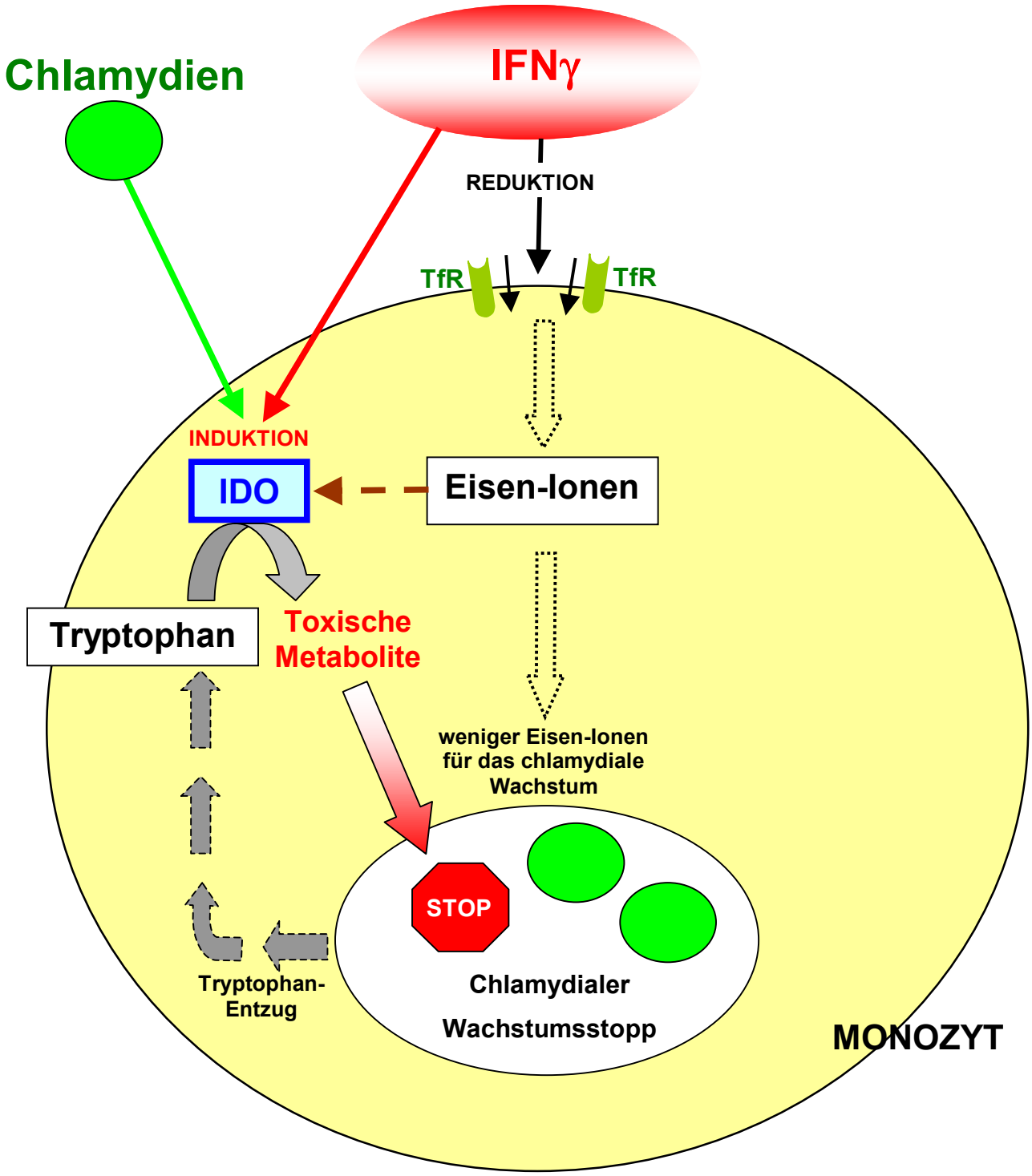

Abb. 46: Chlamydiale Persistenz in Monozyten - ein hypothetisches Modell

Chlamydien und IFNγ induzieren die IDO und damit den Abbau von Tryptophan zu toxischen Metaboliten. Der Entzug der für das chlamydiale Wachstum essentiellen Aminosäure Tryptophan und die toxisch wirkenden Metabolite des Tryptophans verursachen einen Wachstumsstopp der Chlamydien. Parallel bewirkt IFNγ über die Reduktion der Transferrin-Rezeptoren (TfR) eine Verringerung des Transports von Eisenionen in die Zelle. Gleichzeitig benötigt die IDO Häm-Eisen und verbraucht intrazelluläre Eisen-Reserven. Beides führt zur Verarmung an Eisenionen in der Zelle. Auch dies hemmt das chlamydiale Wachstum.

Darüber hinaus existieren Zusammenhänge zwischen dem Tryptophan- und dem Prostaglandin-Stoffwechsel, die relevant für das chlamydiale Wachstum sind:
Eine Überexpression der IDO führte zu einer reduzierten Cyclooxygenase-2-Expression und –Aktivität mit konsekutiv modifiziertem Spektrum der synthetisierten Prostaglandine (Marshall et al., 2001). Tryptophan ist ein Ko-Faktor der Cyclooxygenase. Sowohl die IDO, als auch die COX-2 sind durch IFNγ und LPS induzierbar und eisenabhängige Enzyme. Denkbar wäre somit bei begrenztem Eisen-Angebot in der Zelle eine Konkurrenz von IDO und COX-2 um verfügbares Eisen.
Eine weitere interessante Beobachtung ist in diesem Zusammenhang die Acetylsalicylsäure (ASS)-abhängige Hemmung der Entwicklung von *Chlamydophila pneumoniae* in humanen endothelialen Zellen und HEp-2-Zellen (TIRAN et al., 2002; YONEDA et al., 2003). Durch den COX-Hemmer ASS wird die chlamydiale Entwicklung durch eine bislang nicht genau aufgeklärte Interferenz an der IDO gehemmt. Die Hemmung ist durch Tryptophan-Zusatz aufhebbar (YONEDA et al., 2003).
Der Tryptophan-Stoffwechsel ist somit offensichtlich an der Regulation des COX-2-abhängigen Prostaglandin-Stoffwechsels beteiligt.

Sowohl die IDO, als auch die COX-2 werden durch IFNγ und Chlamydien induziert. Beide Enzyme konkurrieren um Eisen. Ihre differentielle Aktivität wird durch Tryptophan und Arachidonsäure reguliert (UENO et al., 1982). Die Induktion der COX-2 führt einerseits zur Synthese von Entzündungsmediatoren und andererseits reduziert sie die IDO-Aktivität und damit die antichlamydiale Wirkung des Tryptophan-Abbaus und der Synthese toxischer Metabolite (Abb. 47). Umgekehrt führt eine medikamentöse Hemmung der COX-2, z. B. durch ASS zur Steigerung der IDO-Aktivität und damit zu einer stärkeren antichlamydialen Wirkung.

Die Synthese von PGE_2 wäre somit mit einer verminderten antichlamydialen Aktivität der Monozyten durch Hemmung der IDO gekoppelt. Darüber hinaus werden präferentiell Th2-Zytokine gebildet, die unzureichend für eine Elimination intrazellulärer Erreger sind.

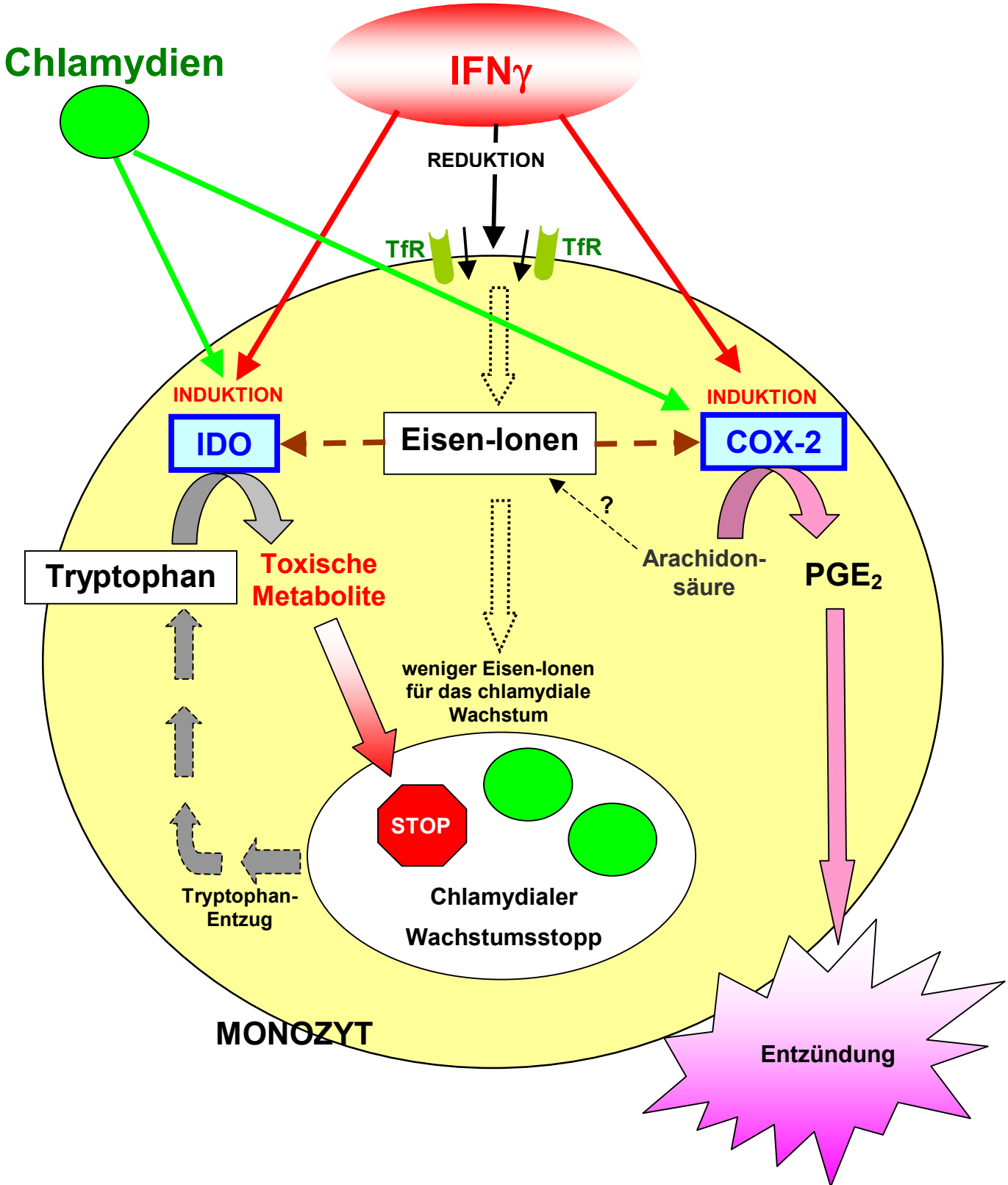

Abb. 47: Zusammenhang zwischen Tryptophan-, Eisen- und Prostaglandin-Stoffwechsel - ein hypothetisches Modell

IFNγ und Chlamydien induzieren gleichzeitig die IDO und COX-2. Beide konkurrieren um Eisen-Ionen. Arachidonsäure, die Ausgangssubstanz der Prostaglandin-Synthese, und Tryptophan haben möglicherweise regulatorische Funktionen auf die Aktivität beider Enzyme. Die Induktion der COX-2 schwächt möglicherweise die IDO-Aktivität und damit deren antichlamydiale Wirkung, so dass keine vollständige Elimination der Chlamydien erfolgen kann.

Zusammengenommen zeigen diese Zusammenhänge ein hochkomplexes System, das Chlamydien befähigt, der körpereigenen Abwehr zu entgehen und in dem Tryptophan, Eisen und Arachidonsäure wichtige Regulatoren an den Stellgrößen IDO-COX-2-Aktivität darstellen, die die chlamydiale Persistenz in monozytären Zellen ermöglichen.

Weitere Untersuchungen müssen die genannten hypothetischen Zusammenhänge prüfen. Eine Aufklärung der präzisen molekularen Mechanismen chlamydialer Persistenz ist notwendig, um gezielte therapeutische Ansätze zur Elimination persistierender Chlamydien-Infektionen zu entwickeln

7 Literatur

1. Adams LB, JB Hibbs Jr, RR Taintor, JL Krahlenbuhl (1990): Microbiostatic effect of murine macrophages for Toxoplasma gondii: role of synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. J. Immunol. 144: 2725-2729.
2. Albers AC, RD Fletcher (1982): Simple Method for Quantitation of viable Mycoplasmas. Appl. Environ. Microbiol. 43: 958-960.
3. Allan I, TP Hatch, JH Pearce (1985): Influence of cysteine deprivation on chlamydial differentiation from reproductive to infective life-cycle forms. J. Gen. Microbiol. 131: 3171-3177.
4. Al-Younes HM, T Rudel, V Brinkmann, AJ Szczepek, TF Meyer (2001): Low iron availability modulates the course of *Chlamydia pneumoniae* infection. Cell. Microbiol. 3(6): 427-437.
5. Balin, BJ, HC Gerard, EJ Arking, DM Appelt, PJ Branigan, JT Abrams, JA Whittum-Hudson, AP Hudso (1998): Identification and localization of *Chlamydia pneumoniae* in the Alzheimer´s brain. Med. Microbiol. Immunol. 187: 23-42.
6. Barile MF (1973): Mycoplasmal flora of simians. J. Infect. Dis. 127:Suppl:S17-20.
7. Barile MF, RA Delgiudice (1972): Isolation of mycoplasmas and their rapid identification by plate epiimmunofluorescence. In: Pathogenic mycoplasmas. A Ciba Foundation Symposium.165-181.
8. Barile M, GJ Mc Garrity (1993): Methods in Mycoplasmology Vol. II, Academic Press, New York. Eds. Tully JG, Razin S.
9. Barnewall RE, Y Rikihisa (1994): Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of Ehrlichia chaffensis infection in human monocytes with iron transferrin. Infect. Immun. 62: 4804-4810.
10. Barrios-Rodiles M, G Tiraloche, K Chadee (1999): Lipopolysaccharide modulates cyclooxygenase-2 transcriptionally and posttranskriptionally in human macrophages independently from endogenous IL-1 beta and TNF-alpha. J. Immunol. 163(2): 963-969.
11. Bas S, R Griffais, TK Kvien, A Glennas, K Melby, TL Vischer (1995): Amplification of plasmid and chromosome chlamydia DNA in synovial fluid of patients with Reactive Arthritis and undifferentiated seronegative oligoarthritis. Arthritis Rheum. 38: 1005-1013.
12. Beatty WL, GI Byrne, RP Morrison (1993): Morphologic and antigenic characterization of interferon γ-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3998-4002.
13. Beatty WL, TA Belanger, AA Desai, RP Morrison, GI Byrne (1994a): Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon mediated chlamydial persistence. Infect. Immun. 62 (9): 3705-3711.
14. Beatty WL, RP Morrison, GI Byrne (1994b): Persistent chlamydiae: From cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. Microbiol. Rev. 58 (4): 686-699.
15. Beatty WL, RP Morrison, GI Byrne (1994c): Reactivation of persistent Chlamydia trachomatis infection in cell culture. Infect Immun. 63: 199-205.
16. Beutler AM, JA Whittum-Hudson, R Nanagara, HR Schumacher, AP Hudson (1994): Intracellular location of inapparently infecting chlamydia in synovial tissue from patients with Reiter´s syndrome. Immunol. Res. 13: 163-171.
17. Beutler AM, HR Schumacher, JA Whittum-Hudson, WA Salameh, AP Hudson (1995): Case report: In situ hybridization for detection of inapparent infection with *Chlamydia*

trachomatis in synovial tissue of a patient with eiter´s syndrome. Am. J. Med. Sci. 310: 206-213.

18. Block SL, MR Hammerschlag, J Hedrick, R Tyler, A Smith, P Roblin, C Gaydos, D Pham, TC Quinn, R Palmer, J McCarty (1997): *Chlamydia pneumoniae* in acute otitis media. Pediatr. Infect. Dis. J. 16: 858-862.
19. Bölske G (1988): Survey of Mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods. Zbl. Bakt. Hyg. A 269: 331-340.
20. Bonk CC (1997): Untersuchung der durch Interferon gamma vermittelten Wachstumsinhibition von Chlamydia trachomatis in monozytären Zellen und die Bedeutung der Indoldiaminooxygenase bei der Erregerpersistenz. Med. Hochschule Hann. Dissertation.
21. Braun, J, S Laitko, J Treharne, U Eggens, P Wu, A Distler, J Sieper (1994): Chlamydia pneumoniae – a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. Ann. Rheum. Dis. 53: 100-105.
22. Brunham RC, IW Maclean, B Binns, RW Peeling (1985): *Chlamydia trachomatis*: Its role in tubal infertility. J. Infect. 152: 1275-1282.
23. Bulut Y, E Faure, L Thomas, H Karahashi, KS Michelsen, O Equils, SG Morrison, RP Morrison, M Arditi (2002): Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. J. Immunol.,168(3):1435-1440.
24. Bush RM, KD Everett (2001): Molecular evolution of the chlamydiae. Int. J. Syst. Evol. Microb. 51: 203-220.
25. Byrd, TF, MA Horwitz (1989): Interferon-gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. J. Clin. Invest. 83: 1457-1465.
26. Byrd TF, MA Horwitz (2000): Abbeantly low transferrin receptor expression on human monocytes is associated with nonpermissiveness for Legionella pneumophila growth. J. Infect. Dis. 181(4): 1394-1400.
27. Cable H, JB Lloyd (1999): Cellular uptake and release of two contrasting iron chelators. J. Pharm. Pharmacol. 51 (2): 131-134.
28. Caldwell HD, J Kromhout, J Schachter (1981): Purification and partial characterization of the outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis.* Infect. Immun. 31: 1161-1176.
29. Campbell LA, DL Patton, DE Moore, AL Cappucio, BA Mueller, SP Wang (1993): Detection of *Chlamydia trachomatis* desoxyribonucleic acid in women with tubal infertility. Fertil. Steril. 59: 45-50.
30. Campbell F, S Birkelund, ME Ward, GS Panayi, GH Kingsley (1996): Sexually-acquired reactive arthritis synovial T cells respond to Chlamydia trachomatis 57 kd heat shock protein but not the major outer membrane protein. Arthritis Rheum.,39(Suppl)**:**S184.
31. Carroll K, R O´Kennedy (1988): The elimination of *Mycoplasma* from infected hybridomas by passaging in BALB/c mice. J. Immunol. Methods 108: 189-193.
32. Cates W, J Wasserheit (1991): Genital chlamydial infections: Epidemiology and reproductive sequelae. Am. J. Obstet. Gynecol. 164:1771-1781.
33. Cheema MA, HR Schumacher, AP Hudson (1991): RNA-directed molecular hybridization screening: Evidence for inapparent chlamydial infection. Am. J. Med. Sci. 302 (5): 261-268.

34. Chiarugi A, PD Sbarba, A Paccagnini, S Donnini, S Filippi, F Moroni (2000): Combined inhibition of indoleamine 2,3-dioxygease and nitric oxide synthase modulates neurotoxin release by interferon-γ-activated macrophages. J. Leuk. Biol. 68: 260-266.

35. Chiarugi A, E Meli, F Moroni (2001): Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolic acid. J. Neurochem. 77: 1310-1318.

36. Clark RB, PF Schatzki, HP Dalton (1982): Ultrastructural analysis of the effects of erythromycin on the morphology and developmental cycle of *Chlamydia trachomatis* HAR-13. Arch. Microbiol. 133: 278-282.

37. Cles L, K Bruch, W Stamm (1988): Stainig characteristics of six commercially available monoclonal immunofluorescence reagents for direct diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. J. Clin. Microbiol. 26: 1735-1737.

38. Cok SJ, AR Morrison (2001): The 3´-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. J. Biol. Chem. 276(25): 23179-23185.

39. Coles AM, DJ Reynolds, A Harper, A Devitt, JH Pearce (1993): Low-nutrient induction of abnormal chlamydial development: A novel component of chlamydial pathogenesis. FEMS Microbiol. Lett. 106: 193-200.

40. D'Andrea A (1993): Interleukin 10 (IL10) inhibits human lymphocyte interferon g production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL12 synthesis in accessory cells. J. Exp. Med. 178: 1041-1048.

41. Däubener W, K Pilz, S Seghrouchni Zennati, T Bilzer, HG Fischer, U Hadding (1993): Induction of toxoplasmostasis in human glioblastoma by interferon gamma. J. Neuroimmunol. 43 (1-2): 31-38.

42. de Waal Malefyt R, J Abrams, B Bennett, CG Figdor, JE de Vries (1991): Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med. 174(5):1209-1220.

43. Dimier ICH, DT Bout (1998): Interferon-γ-activated primary enterocytes inhibit Toxoplasma gondii replication: a role for intracellular iron. Immunology 94: 488-495.

44. Dixon DA, CD Kaplan, TM McIntyre, GA Zimmerman, SM Prescott (2000): Post-transcriptional control of cyclooxygenase expression. J. Biol. Chem. 275: 11750-11757.

45. Dreses-Werringloer U, I Padubrin, B Jürgens-Saathoff, AP Hudson, H Zeidler, L Köhler (2000): Persistence of *Chlamydia trachomatis* is induced by ciprofloxacin *in vitro.* Antimicrob Agents Chemother. 44(12):3288-97

46. Duffurget O, D Rouilland-Dissoix (1994): Appl. Environ. Microbiol. 953-959.

47. Emre U, PM Roblin, M Gelling, W Dumornay, M Rao, MR Hammerschlag, J Schachter (1994): The association of *Chlamydia pneumoniae* infection and reactive airways disease in children. Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 148: 727-732.

48. Endo T, F Ogushi, S Sone (1996): LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down regulated by IL-13 but not by IFN-gamma. J. Immunol. 156: 2240-2246.

49. Eremeeva ME, NM Balayeva, D Raoult (1994): Purification of Rickettsial cultures contaminated by Mycoplasmas. Acta Virol. 38: 231-233.

50. Everett KD, RM Bush, AA Andersen (1999): Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int. J. Syst. Evol. Microb. 49: 415-440.

51. Faour WH, Y He, QW He, M de Ladurantaye, M Quintero, A Mancini, JA Battista (2001): Prostaglandin E_2 regulates the level and stability of cyclooxygenase-2-mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase i interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. J. Biol. Chem. 26(34): 31720-31731.

52. Firestine G, N Zvaifler (1987): Reactive arthritis. Ann. Rev. Med. 38: 351-360.

53. Fogh J (ed) (1973): Contamination in tissue culture. Academic press, New York.

54. Fox R, A Colin, RC Gerber, D Gibson (1979): The chronicity of symptoms and disability in Reiter´s syndrome. An analysis of 131 consecutive patients. Ann. Intern. Med. 91: 190-193.

55. Fryden A, E Kihlstrom, R Maller, K Persson, V Romanus, S Ansehn 1989: A clinical and epidemiological study of “ornithosis” caused by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). Scand. J. Infect. Dis. 21: 681-691.

56. Fukushi H, K Hirai (1992): Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for Chlamydia strains derived from ruminants. Int. J. Syst. Bacteriol. 42 : 306-308.

57. Fukuchi K, S Tomoyasu, N Tsuruoka, K Gomi (1994): Iron deprivation-induced apoptosis in HL-60 cells. FEBS Lett. 15, 350 (1): 139-42

58. Gaston JSH, KHO Deane, RM Jecock, JH Pearce (1996): Identification of 2 Chlamydia trachomatis antigens recognized by synovial fluid T cells from patients with Chlamydia-induced reactive arthritis. J. Rheumatol. 23:130-136.

59. Gérard HC, PJ Branigan, HR Schumacher, AP Hudson (1998a): Synovial *Chlamydia trachomatis* in Patients with reactive arthritis/Reiter´s syndrome are viable but show abberant gene expression. J. Rheumatol. 25(4): 734-742.

60. Gérard HC, PJ Branigan, GR Balsara, C Heath, SS Minassian, AP Hudson (1998b) : Viability of Chlamydia trachomatis in fallopian tbes of patients with ectopic pregnancy. Fertil. Steril. 70(5): 945-948.

61. Goodall JC, G Yeo, M Huang, R Raggiaschi, JS Gaston (2001): Identification of Chlamydia trachomatis antigens recognized by human CD4+ T lymphocytes by screening an expression library. Eur. J. Immunol., 31(5):1513-1522.

62. Grayston JT, SP Wang, LJ Yeh (1985) : Importance of reinfection in the pathogenesis of trachoma. Rev. Infect. Dis. 7: 717-725.

63. Grayston JT, MB Aldous, A Easton, SP Wang, CC Kuo, LA Campbell, J Altman (1993): Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. I. Inf. Dis. 168 : 1231-1235.

64. Green SJ, S Mellouk, SL Hoffman, MS Meltzer, CA Nacy (1990): Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. Immunol. Lett. 25(1-3): 15-19.

65. Greendale GA, ST Haas, K Holbrook, B Walsh, J Schachter, RS Philipps (1993): The relationship of Chlamydia trachomatis infection and male infertility. Am. J. Publ. Health 83:996-1001.

66. Hahn DL, HW Dodge, R Golubjatnikov (1991) : Association of Chlamydia pneumoniae (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis and adult-onset asthma. Jama 266: 225-230.

67. Haidl S, S Ivarsson, I Bjerre, K Persson (1992): Guillain-Barré syndrome after *Chlamydia pneumoniae* infection. N. Engl. J. Med. 326: 576-577.

68. Hammer M, E Nettelnbreker, S Hopf, E Schmitz, K Pörschke, H Zeidler (1992): Chlamydial rRNA in the joints of patients with Chlamydia-induced arthritis and undifferentiated arthritis. Clin. Exp. Rheumatol. 10: 63-66.

69. Hannan PCT (1995): Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma fermentans* strains from various sources and the development of resistance to aminoglycosides in vitro. J. Med. Microbiol. 42: 421-428.

70. Hannan PCT (1998): Comparative susceptibilities of various AIDS associated and human urogenital tract mycoplasmas and strains of *Mycoplasma pneumoniae* to 10 classes of antimicrobial agents *in vitro*. J. Med. Microbiol. 47: 1115-1122.

71. Hatch TP (1975): Competition between Chlamydia psittaci and L cells for host isoleucine pools: A limiting factor in chlamydial multiplication. Inf. Immun. 12(1): 211-220.

72. Hatch TP (1996):Disulfide cross-linked envelope proteins. The functional equivalent of peptidoglycan in Chlamydiae? J. Bacteriol. 178: 1-5.

73. Hay RJ, ML Macy, TR Chen (1989): Mycoplasma infection of cultured cells. Nature 339: 487-488.

74. Hess S, C Rheinheimer, F Tidow, G Bartling, C Kaps, J Lauber, J Buer, A Klos (2001): The reprogrammed host: Chlamydia trachomatis-induced up-regulation of glycoprotein 130 cytokines, transcription factors, and antiapoptotic genes. Arthritis Rheum. 44(10):2392-2401.

75. Hodinka RL, CH Davis, J Choong, PB Wyrick (1988): Ultrastructural study of endocytosis of *Chlamydia trachomatis* by McCoy cells. Infect. Immun. 56: 456-463.

76. Holland SM, AP Hudson, L Bobo, JA Whittum-Hudson, RP Viscidi, TC Quinn, HR Taylor (1992): Demonstration of chlamydial RNA and DNA during a culture negative state. Inf. Imm. 60 (3): 2040-2047.

77. Holmes EW (1998): Expression and regulation of interferon-gamma-induced tryptophan catabolism in cultured skin fibroblasts. J Interferon Cytokine Res. 18: 509-520.

78. Hudson AP, CM McEntee, M Reacher, JA Whittum-Hudson, HR Taylor (1992): Inapparent ocular infection by *Chlamydia trachomatis* in experimental and human trachoma. Current Eye Research 11: 279-283.

79. Humar B, O Giovanoli, A Wolf, M Attenhofer, I Bendik, R Meier, H Müler, Z Dobbie (2000): Germline Alterations in the cyclooxygenase-2 gene are not associated with the development of extracolonic manifestations in a large swiss familial adenomatous polyposis kindred. 87: 812-817.

80. Huniche BS, LT Jensen, S Birkelund, G Christiansen (1998): Mycoplasma Contamination of Chlamydia pneumoniae Isolates. Scand. J. Infect. Dis. 30: 181-187.

81. Ingalls RR, PA Rice, N Qureshi, K Takayama, J Shin Lin, DT Golenbock (1995): The inflammatory cytokine response to Chlamydia trachomatis infection is endotoxin mediated. Infect. Immun. 63: 3125-3130.

82. Ischikawa H, O Ohno, K Yamaski, S Kuta, K Hirohata (1986): Arthritis presumably caused by Chlamydia in Reiter syndrome. J. Bone Joint Surg. 68 :777-779.

83. Johnson FWA, D Hobson (1977) : The effect of penicillin on genital strains of Chlamydia trachomatis in tissue culture. J. Antimicrob. Chemother. 3: 49-56.

84. Kane JL, RM Woodland, T Forsey, S Darougar, MG Elder (1984): Evidence of chlamydial infection in infertile women with and without fallopian tube obstruction. Fertil. Steril. 42: 843-848.

85. Keat AC, BJ Thomas, J Dixey, M Osborne, L Sonnex, D Taylor-Robinson (1987): *Chlamydia trachomatis* and Reactive Arthritis – The missing link. Lancet: 72-74.

86. Keat AC, RN Maini, GD Pegrum, JT Scott (1979): The clinical features and HLA associations of reactive arthritis associated with nongonococcal urethritis. Quart. J. Med. 190: 323-342.

87. Kiviat NB, P Wølner-Hansen, MD Peterson, J Wasserheit, WE Stamm, DA Eschenbach, J Paavonen, J Lingenfelter, T Bell, V Zabriskie, B Kirby, KK Holmes (1986): Localization of *Chlamydia trachomatis* infection by direct immunofluorescence and culture in pelvic inflammatory disease. Am. J. Obstet. Gynecol. 154: 865-873.

88. Koehler L, E Nettelnbreker, AP Hudson, N Ott, HC Gérard, HC Branigan, PJ Schuhmacher, W Drommer, H Zeidler (1997): Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of *Chlamydia trachomatis* (serovar K) in human monocytes. Microb. Pathogen. 22: 133-142.

89. Korman TM, JD Turnidge, ML Grayston (1997): Neurological complications of chlamydial infections: case report and review. Clin. Infect. Dis. 25: 847-851.

90. Kramer MJ, FB Gordon (1971): Ultrastructural analysis of the effects of penicillin and chlortetracyclin on the development of a genital tract Chlamydia. Infect. Immun. 3: 333-341.

91. Kraußе-Opatz B, P Dollmann, H Zeidler, JG Kuipers, L Köhler (2000): Frequent contamination of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* strains with mycoplasma. Biological relevance and selective eradication of mycoplasma from chlamydial cultures with mupirocin. Med. Microbiol. Immunol. 189: 19-26.

92. Kuo CC (1988): Host response. In: Barron A (ed): Microbiology of chlamydia. CRC Press Boca Raton, Florida. p: 194-205.

93. Kuipers JG, B Jürgens-Saathoff, A Bialowons, J Wollenhaupt, L Köhler, H Zeidler (1998): Detection of *Chlamydia trachomatis* in peripheral blood leukocytes in reactive arthritis by PCR. Arthritis Rheum. 41: 1894-1895.

94. Kujubu DA, BS Fletcher, BC Varnum, RW Lim (1991): TIS10, a phorbol ester tumor promotor-inducible mRNA from swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. J. Biol. Chem. 266:12866-12872.

95. Lang K (1985): Mycoplasmen und Zellkulturen. Biol. uns. Zeit. VCH-Verlag. 2: 53-61.

96. Lee CK (1981): Factors affecting the rate at which a trachoma strain of *Chlamydia trachomatis* establishes a persistent infection in mouse fibroblasts (McCoy cells). Inf. Immun. 33: 954-960.

97. Lee CK, J Moulder (1981): Persistent infection of mouse fibroblasts (McCoy cells) with a trachoma strain of *Chlamydia trachomatis*. Inf. Immun. 32: 822-827.

98. Lee SH, E Soyoola, P Chanmugam, S Hart, W Sun, H Zhong, S Liou, D Simmons, D Hwang (1992): Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. J. Biol. Chem. 267: 25934-25938.

99. Levitt D, J Barol (1987): The immunobiology of chlamydia. Immunology Today 8: 246-251, 1987.

100. Lloyd JB, H Cable, C Rice-Evans (1991): Evidence that desferrioxamine cannot enter cells by passive diffusion. Biochem. Pharmacol. 41 (9): 1361-1363.

101. MacKenzie CR, R Langen, O Takikawa, W Däubener (1999): Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophages inhibits interferon-γ-induced bacteriostasis but does not abrogate toxoplasmostasis. Eur. J. Immunol. 29: 3254-3261.

102. Marchant AE, S Bhandari, MJ Farr (1995): Reversible acute renal failure associated with *Chlamydia pneumoniae* infection. Nephrol. Dial. Transplant. 10: 693-695.

103. Marshall B, DB Keskin, AL Mellor (2001): Regulation of prostaglandin synthesis and cell adhesion by a tryptophan catabolizing enzyme. BMC Biochem. 2: 5

104. Masferrer JL, BS Zweifel, K Seibert, P Needleman (1990): Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. J. Clin. Invest. 86:1375-1379.

105. Mathur S, P Genco, B MØller, PA Mardh (1985): Antibodies to microbial leukocyte and organ antigens. J. Reprod. Immunol. 8: 353-358.

106. Matsumoto A, GP Manire (1970): Electron microscopic observation on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. J. Bacteriol. 101 (1): 278-285.

107. Matyszak MK, JSH Gaston (2002): Characterization of CD8+ T cell clones specific for Chlamydia trachomatis. Clin. Exp. Rheum.,20(4):584.

108. Mayer J, ML Woods, Z Vavrin, JB Hibbs (1993): Gamma-interferon-induced nitric oxide production reduces *Chlamydia trachomatis* infectivity in McCoy cells. Infect. Immun. 61: 491-497.

109. Messmer TO, CM Black, WL Thacker (1994): Mycoplasma conatmination of chlamydia isolated from clinical specimens. APMIS 102: 793-796.

110. Metha JL, TGP Saldeen, K Rand (1998): Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. J. Am. Coll. Cardiol. 31: 1217-1225.

111. Michel D, JC Antoine, B Pozzetto, OG Gaudin, F Lucht (1992): Lumbosacral meningoradiculitis associated with *Chlamydia pneumoniae* infection. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 55: 511.

112. Moore A, L Sabachewsky, HW Toolan (1955): Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. Cancer Res. 15: 598-602.

113. Morita T, K Saito, M Takemura, N Maekawa, S Fujigaki, H Fujii, H Wada, S Takeuchi, A Noma, M Seishima (2001): 3-Hydroxyanthranilic acid, an L-tryptophan metabolite, induces apoptosis in monocyte derived cells stimulated by interferon-gamma. Ann. Clin Biochem. 38: (Pt 3): 242-251.

114. Mosmann TR, RL Coffman (1989a): Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. Adv. Immun. 111-147.

115. Mosmann TR, RL Coffman (1989b): Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann. Rev. Immun. 7: 145-173.

116. Moulder JW (1988): Characteristics of chlamydiae. In: Barron A, J Turco (eds) Microbiology of chlamydia. CRC press, Boca Raton, Florida: 3-20.

117. Moulder JW (1991): Interaction of chlamydiae and host cells *in vitro*. Microbiol. Rev. 55(1): 143-190.

118. Murray HW, AM Granger, RF Teitelbaum (1991): Gamma Interferon-Activated Human Macrophages and *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci*, and *Leishmania donovani*: Antimicrobial Role of Limiting Intracellular Iron. Infect. Immun. 4684-4686.

119. Nanagara R, F Li, A Beutler, AP Hudson, HR Schumacher (1995): Alteration of Chlamydia trachomatis biologic behavior in synovial membranes. Arthritis Rheum. 38: 1410-1417.

120. Narumi S, JH Finke, TA Hamilton (1990): Interferon gamma and interleukin-2 synergize to induce selektive monokine expression in murine peritoneal macrophages. J. Biol. Chem. 265: 7036-7041.

121. Nissen E, G Pauli, D Vollenbroich (1996): Comparison of PCR detection methods for mycoplasma in cell cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 32: 463-464.

122. Norton R, S Schepetiuk, TW Kok (1995): *Chlamydia pneumoniae* pneumonia with endocarditis. Lancet 345: 1376-1377.

123. Ogawa H, K Hashiguchi, Y Kazuyama (1992): Recovery of *Chlamydia pneumoniae* in six patients with otitis media with effusion. J. Laryngol. Otol. 106: 490-492.

124. Ossewarde JM, A de Vries, T Bestebroer, AF Angulo (1996): Application of a group specific PCR for monitoring decontamination of Mycoplasma infected *Chlamydia sp.* strains. Appl. Environ. Microbiol. 62 (2): 328-331.

125. Pantoja LG, RD Miller, JA Ramirez, RE Molestina, JT Summersgill (2001): Characterization of Chlamydia pneumoniae in HEp-2 cells treated with gamma interferon. Infect. Immun. 69: 7927-7932.

126. Patton DL, M Askienazy-Elbhar, J Henry-Suchet, LA Campbell, A Cappucio, WT Tannous, SP Wang, CC Kuo (1994): Detection of *Chlamydia trachomatis* in fallopian tube tissue in women with postinfectious tubal infertility. Am. J. Ostet. Gynecol. 171: 95-101.

127. Pfefferkorn ER (1984): Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host sells to degrade tryptophan. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 81(3): 908-912.

128. Pollok RC, MJ Farthing, M Bajaj-Elliott, IR Sanderson, Y Mc Donald (2001): Intrferon gamma induces enterocyte resistence against infection by the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum*. Gastroenterology 120(1): 99-107.

129. Poulakkainen M, LA Campbell, CC Kuo, M Leinonen, C Gronhagen-Riska, P Saikku (1996): Serological response to Chlamydia pneumoniae in patients with sarcoidosis. J. Infect. 33:199-205.

130. Purvis K., E Christiansen (1993): Infection in the male reproductive tract: Impact, diagnosis and treatment in rlation to male infertility. Int. J. Androl. 16: 1-13.

131. Rahman MU, HR Schumacher, AP Hudson (1992): Recurrent arthritis in Reiter´s syndrome: A function of inapparent chlamydial infection of the synovium? Sem. Arthritis Rheum. 21: 259-266.

132. Raulston JE (1997): Response of *Chlamydia trachomatis* Serovar E to Iron Restriction *in vitro* and Evidence for Iron-Regulated Chlamydial Proteins. Infect. Immun. 4539—4547.

133. Ravaoarinoro M, J Lecomte (1988): Evaluation of three methods for curing hybridomas from Mycoplasma contamination. Hybridoma 7: 79-86.

134. Razin S, D Yogev, Y Naot (1998): Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1094-1156.

135. Romagnani S (1991): Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. Immunology Today 12: 256-257.

136. Rothermel CD, J Schachter, P Lavrich, EC Lipsitz, T Francius (1989): Chlamydia trachomatis induced production of interleukin-1 by human monocytes. Infect. Immun. 57: 2705-2711.

137. Rottenberg ME, A Gigliotti-Rothfuchs, H Wigzell (2002): The role of IFN-γ in the outcome of chlamydial infection. Curr. Op. Immunol. 14: 444-451.

138. Ross R (1993): The pathogenesis of atheriosclerosis: A perspective for the 1990s. Nature 362: 801-809.

139. Samra Z, Y Soffer, M Pansky (1994): Prevalence of genital chlamydia and mycoplasma infection in couples attending a male infertility clinic. Eur. J. Epidemiol. 10 : 69-73.

140. Saito K, CY Chen, M Masana, JS Crowley, SP Markey, MP Heyes (1993): 4-Chloro-3-hydroxyanthranilate, 6-chlorotryptophan and norharmane attenuate quinolic acid formation by interferon-γ-stimulated monocytes (THP-1-cells). Biochem. J. 291: 11-14.

141. Schachter J, J Moncada, CR Dawson, J Sheppard, P Courtright, ME Said, S Zaki, SF Hafez, A Lorincz (1988): Nonculture methods for diagnosing chlamydial infection in

patients with trachoma: A clue to the pathogenesis of the disease? J. Inf. Dis. 158: 1347-1352.

142. Schneemann M, G Schoedon, S Hofer, N Blau, L Guerrero, A Schaffner (1993): Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. J. Infect. Dis. 167: 1358-1363.

143. Schumacher HR, S Maggae, PV Cherian, J Sleckman, S Rothfuss, G Clayburne, M Siek (1988): Light and electron microscopic studies on the synovial membrane in Reiter´s syndrome. Immunocytochemical identification of Chlamydia antigen in patients with early disease. Arthritis Rheum. 31: 937-946.

144. Sellors JW, JB Mahony, MA Chernesky, DJ Rath (1988): Tubal factor infertility: An association with prior chlamydial infection and asymptomatic salpingitis. Fertil. Steril. 49: 451-457.

145. Sengupta S, BC Jang, MT Wu, JH Paik, H Furneaux, T Hla (2003): The RNA-binding protein HuR regulates the expression of cyclooxygenase-2. 18

146. Shemer-Avni Y, D Wallach, I Sarov (1989): Reversion of the antichlamydial effect of tumor necrosis factor by tryptophan and antibodies to beta interferon. Infect. Immun. 57: 3484-3490.

147. Shemer Y, I Sarov (1985): Inhibition of growth of *Chlamydia trachomatis* by human gamma interferon. Infect. Immun. 48: 592-596.

148. Shepard MK, RB Jones (1989): Recovery of *Chlamydia trachomatis* from endometrial and fallopian tube biopsies in women with infertility of tubal origin. Fertil. Steril. 52: 232-238.

149. Socan M, B Beovic, D Kese (1994): *Chlamydia pneumoniae* and meningoencephalitis. N. Engl. J. Med. 331-406.

150. Soong YK, SM Kao, CJ Lee, PS Lee, CC Pao (1990): Endocervical chlamydial desoxyribonucleic acid in infertile women. Fertil. Steril. 54: 815-818.

151. Sriram S, W Mitchell, C Stratton (1998): Multiple sclerosis associated with *Chlamydia pneumoniae* infection of the CNS. Neurology 50: 571-572.

152. Storz J (1988): Overview of animal diseases by chlamydial infections. In: Barron A, J Turco (eds) Microbiology of chlamydia. CRC press, Boca Raton, Florida: 167-192.

153. Sundelof B, H Gnarpe, J Gnarpe (1993): An unusual manifestation of *Chlamydia pneumoniae* infection: meningitis, hepatitis, iritis and atypical erythema nodosum. Scand. J. Infect. Dis. 25: 427-428.

154. Taetle R, JM Honeysett (1988): γ-Interferon modulates human monocyte/macrophage transferrin receptor expression. Blood 71: 1590-1595.

155. Tanabe T, N Tohnai (2002): Cyclooxygenase isoenzymes and their gene structures and expression. Prostaglandins Other Lipid Mediat 68-69: 95-114.

156. Taylor HR, SL Johnson, RA Prendergast, J Schachter, CR Dawson, AM Silverstein (1982): An animal model of trachoma. II. The importance of repeated reinfection. Invest. Ophthalmol. Vis. Si. 23: 507-515.

157. Taylor-Robinson D, CB Gibroy, BJ Thomas, ACS Keat (1992): Detection of *Chlamydia trachomatis* in the joints of reaktiv arthritis by polymerase chain reaction. Lancet 340: 81-82.

158. Taylor-Robinson D, A Keat (2001): How can a causal role for small bacteria in chronic inflammatory arthritides be established or refuted? Ann. Rheum. Dis. 60: 177-184.

159. Theijls H, J Gnarpe, Ö Lundkvist, G Heimer, G Larsson, A Victor (1991): Diagnosis and prevalence of persistent chlamydia infection in infertile women: Tissue culture, direct antigen detection, and serology. Fertil. Steril. 55: 304-310.

160. Thiel A, P Wu, R Lauster, J Braun, A Radbruch, J Sieper (2000): Analysis of the antigen-specific T cell response in reactive arthritis by flow cytometry. Arthritis Rheum., 43(12):2834-2842.

161. Thom DH, JT Grayston, SP Wang, CC Kuo, J Altman (1990): *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR, *Mycoplasma pneumoniae* and viral infections in acute respiratory disease in a university student health clinic population. Am. J. Epidemiol. 132: 248-256.

162. Thomas SR, R Stocker (1999): Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophane metabolism along the kynurenine pathway. Redox. Rep. 4(5): 199-220.

163. Thylefors B, AD Negrel, R Panrarajasegaram, KY Dadzie (1995): Global data on blindness. Bull. World Health Organ. 73: 115-121.

164. Tiran A, HJ Gruber, WF Graier, AH Wagner, EBM van Leeuwen, B Tiran (2002): Aspirin inhibits Chlamydia pneumoniae-induced nuclear factor-κB activation, cytokine expression, and bacterial development in human endothelial cells. Artherioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22: 1075-1080.

165. Todd WJ, AM Doughri, J Storz (1976): Ultrastructural changes in host cellular organellesin the course of the chlamydial developmental cycle. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A. 236: 359-373.

166. Tsuchiya S, M Yamabe, Y Yamaguchi, Y Kobayashi, T Konno, K Tada (1980): Establishment and characterisation of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int. J. Cancer 26: 171-176.

167. Ueno R, T Shimizu, K Kondo, O Hayaishi (1982): Activation mechanism of prostaglandin endoperoxide synthetase by hemoproteins. J. Biol. Chem. 257: 5584-5588.

168. Uphoff CC, HG Drexler (2002): Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 38(2):79-85.

169. Van Nerom A, R Ducatelle, G Charlier, F Haesebrouck (2000): Interaction between turkey monocytes and avian *Chlamydia psittaci* in the presence of *Mycoplasma* sp.: The importance of nitric oxide. Dev. Comp. Immunol. 24: 417-432.

170. Verkooyen RP, M Sijmonis, E Fries, A Van Belkum, HA Verbrugh (1997): Widley used, commercially available Chlamydia pneumoniae antigen contaminated with mycoplasma. J. Med. Microbiol. 46: 419-424.

171. Wang S, J Grayston (1990): Three new serovars of *Chlamydia trachomatis*: Da, Ia and L2a. J. Infect. Dis. 163: 403-405.

172. Ward, A, DM Campoli-Richards (1986): Mupirocin. A Review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. Drugs 32: 425-444.

173. Ward ME, A Murray (1984): Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for HeLa cells: mechanisms of endocytosis. J. Gen. Microbiol. 130: 1765-1780.

174. Ward ME (1995):The immunobiology and immunopathology of chlamydial infections. APMIS 103: 769-796.

175. Ward ME, R Bailey, A Lesley, M Kajbaf, J Robertson, D Mabey (1990): Persisting inapparent chlamydial infection in a trachoma endemic community in The Gambia. Scand. J. Infect. Dis. 69 137-148.

176. Wesslen L, C Pahlson, G Friman, J Fohlman, O Lindquist, C Johansson (1992): Myocarditis caused by *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) and sudden unexpected death in a Swedish elite orienteer. Lancet 340: 427-428.

177. WHO (World Health Organization). Global prevalence and incidence f selected curable sexually transmitted diseases: overview ans estimates. Geneva: WHO 1996.

178. Wirth M, E Berthold, M Grashoff, H Pfützner, U Schubert, H Hauser (1994): Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction. Cytotechnology 16: 67-77.

179. Wollenhaupt J, H Zeidler (1990): Die Chlamydien-induzierte Arthritis. Medwelt 41: 346-353.

180. Wu D, MG Hayek, S Meydani (2001): Vitamin E and macrophage cyclooxygenase regulation in the aged. J. Nutr. 131(2): 382S-8S.

181. Wyrick PB, J Choong, CH Davis, ST Knight, MO Royal, AS Maslow, CR Bagnell (1989): Entry of genital *Chlamydia trachomatis* into polarized human epithelial cells. Ainfect. Immun. 57: 2378-2389.

182. Wyrick PB, CH Davis, ST Knight, J Choong, JE Raulston, N Schramm (1993): An *in vitro* human epithelial cell culture system for studying the pathogenesis of *Chlamydia trachomatis*. Sex. Trans. Dis. 20: 248-256.

183. Xie W, JG Chipman, DL Robertson, RL Erikson, et al. (1991): Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2692-2696.

184. Yoneda H, K Miura, H Matsushima, K Sugi, T Murakami, K Ouchi, K Yamashita, H Itoh, T Nakazawa, M Suzuki, M Shirai (2003): Aspirin inhibits *Chlamydia pneumoniae*-induced NF-κB activation, cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E_2 synthesis and attenuates chlamydial growth. J. Med. Microbiol. 52: 409-415.

185. Zeidler H (1991): Chlamydia-induced arthritis. Clinical features, diagnosis and therapy. In: Balint, G. (ed) Rheumatology. State of the art. Proc. XII Europ. Cong. Rheumatol. p. 49-62.

8 Eigene Publikationen

1. Frosch, M., U. Edwards, K. Bousset, **B. Krauße**, C. Weisgerber. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in Gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. Mol. Microbiol. 5 (5): 1251-1263, 1991.
2. **Krauße-Opatz, B.**, U. Köhler, R. Schopf. Zum energetischen Status von *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae) während der Jungkäferentwicklung, Überwinterung, Dispersion und Eiablage. J. Appl. Ent. 119 : 185-194, 1995.
3. **Krauße-Opatz, B.**, P. Dollmann, H. Zeidler, J.G. Kuipers, L. Köhler. Frequent contamination of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* strains by mycoplasma, the biological relevance and selective eradication of mycoplasma from chlamydial cultures. Med. Microbiol. Immun. 189: 19-26, 2000.
4. Jendro, M.C., T. Deutsch, B. Körber, L. Köhler, J.G. Kuipers, **B. Krauße-Opatz**, J. Westermann, E.E. Raum, H. Zeidler. Infection of human monocyte-derived macrophages with *Chlamydia trachomatis* induce apoptosis of preactivated T cells: A potential mechanism for persistent infection. Infection Immun. 68: 6704-6711, 2000.
5. **Krauße-Opatz, B.**, P. Dollmann, H. Zeidler, L. Köhler, J.G. Kuipers. *Mycoplasma fermentans*, M. hominis, and *M. hyorhinis* inhibit infectivity and growth of *Chlamydia trachomatis* and *C. pneumoniae* in HEp-2 cells. J. Clin. Microbiol. 38: 3910-3911, 2000.
6. Gérard, H.C., **B. Krauße-Opatz**, D. Rudy, H. Zeidler, H.R. Schumacher, J. Whittum-Hudson, L. Köhler, A.P. Hudson. Expression of *Chlamydia trachomatis* genes required for DNA synthesis and cell division in active vs. persistent infection. Mol. Microbiol. 41: 731-741, 2001.
7. Gérard, H.C., J. Freise, D. Rudy, **B. Krauße-Opatz**, L. Köhler, H. Zeidler, H.R. Schumacher, J. Whittum-Hudson, A.P. Hudson. Energy metabolism of *Chlamydia trachomatis* during active vs. persistent infection. Microbes Infect. 4: 13-22, 2002.

8.1 Abstracts

1. Koehler, L., **B. Krauße-Opatz**, P. Dollmann, H. Zeidler, J.G. Kuipers. Contamination of chlamydia with Mycoplasma and biological implication. Arthritis Rheum. 42: 336, 1999. Congress of the American College of Rheumatology, Boston, *Poster*.
2. Gérard, H.C., D. Rudy, **B. Krauße-Opatz**, H. Zeidler, L. Köhler, H.R. Schumacher, J.A. Whittum-Hudson, A.P. Hudson. Expression of *C. trachomatis* genes required for DNA synthesis/cell division in active vs. persistent infection. Arthritis Rheum. 42: 384, 1999, Congress of the American College of Rheumatology, Boston, *Poster*.
3. Hudson, A.P., D. Rudy, **B. Krauße-Opatz**, H. Zeidler, L. Köhler, H.R. Schumacher, J.A. Whittum-Hudson, H.C. Gérard. Energy metabolism of *C. trachomatis* during active vs. persistent infection. Arthritis Rheum. 42: 336, 1999, Congress of the American College of Rheumatology, Boston, *Poster*.
4. **Krauße-Opatz, B.**, P. Dollmann, H. Zeidler, J.G. Kuipers, L. Köhler. Mycoplasma contamination affects the biological behaviour of Chlamydia in vitro.

Immunobiology 2000: 667, 1999, 30.Tagung der Gesellschaft für Immunologie, Hannover, *Poster*.

5. **Krauße-Opatz, B.**, C. Schmidt, U. Fendrich, V. Kaever, H. Zeidler, L. Köhler. Synthese von Prostaglandin E2 während der in vitro Infektion von humanen, peripheren Monozyten mit *Chlamydia trachomatis*. Z. Rheumatol. 59:III/75, 2000, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Aachen, *Poster*.
6. **Krauße-Opatz, B.**, P. Dollmann, H. Zeidler, J.G. Kuipers, L. Köhler. Mycoplasma contamination of Chlamydia isolates: Biological relevance and effective purification method. In: Proceedings of the 4th meeting of the European Society for Chlamydia research (Ed. P. Saikku,. Universitas Helsingiensis) 2000: 36, IV European Chlamydia Congress `Chlamydia 2000´ Helsinki, *Poster*.
7. **B. Krauße-Opatz,** C. Schmidt, U. Fendrich, V. Kaever, H. Zeidler, L. Köhler. Prostaglandin E_2 –production in human peripheral blood monocytes infected by *Chlamydia trachomatis in vitro.* Int. J. Med. Microbiol. 291, Suppl. 32, p27, 2001, 53. DGHM-Kongress Aachen, *Poster*.
8. **Krauße-Opatz, B.**, H. Gérard, D. Rudy, H. Zeidler, A. Hudson, L. Koehler. Vergleich der Expression von *Chlamydia trachomatis* spezifischen Genen der DNA Synthese und Zellteilung während replikativer vs. persistierender Infektion. Z. Rheumatol. 60: I/92-93, 2001, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Leipzig, *Poster*.
9. Wagner, A., U. Wittkop, **B. Krauße-Opatz**, T. Gust, L. Köhler, M. Zenke, H. Zeidler. Infektion von humanen aus Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen mit *Chlamydia pneumoniae*. Z. Rheum. 61: 69, 2002, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Berlin, *Poster*.
10. Wagner, A., U. Wittkop, **B. Krauße-Opatz**, T. Gust, L. Köhler, M. Zenke, H. Zeidler. Infection of monocyte derived dendritic cells by *Chlamydia pneumoniae* persists in vitro. Arthritis Rheum. 46 (suppl.): 224, Congress of the American College of Rheumatology, New Orleans, *Poster* 2002.
11. **Krauße-Opatz, B.**, H. Zeidler, L. Koehler. Prostaglandin E_2-synthesis of monocytes is induced by *Chlamydia trachomatis*. Arthritis Rheum. 46 (suppl.): 570, 2002, Congress of the American College of Rheumatology, New Orkeans, *Poster*.

8.2 Poster

1. **Krauße-Opatz, Birgit**, Kuipers Jens, Wollenhaupt, Jürgen, Zeidler, Henning, Köhler, Lars. Semiquantitative PCR for the Major Outer Membrane Protein (MOMP) Gene of *Chlamydia trachomatis*. 9th International Symposium on Human Chlamydial Infection, Napa Valley, California 1998, *Poster*.
2. **B. Krauße-Opatz**, C. Schmidt, U. Fendrich, V. Kaever, H. Zeidler, L. Köhler. *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* in inflammation – PGE_2-synthesis in infected monocytes. Xth International Symposium on Human Chlamydial Infections, Antalya 2002, *Poster*.
3. **B. Krauße-Opatz**, C. Schmidt, U. Fendrich, T. Höhler, V. Kaever, H. Zeidler, L. Köhler. Induction of PGE_2- and cytokine secretion during persistent infection of monocytes with *Chlamydia trachomatis in vitro.* First Biennal Meeting of the Chlamydia Basic Research Society 2003, Memphis, *Poster*.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Birgit Kraußе-Opatz
Anschrift:	Posthornstraße 24 30449 Hannover
Telefon:	0511 - 52 85 79
Geburtsdatum und -ort:	2.1.1964 in Hannover
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Kinder:	Lea Opatz, geb. am 4.12.1993 Saskia Opatz, geb. am 1.8.1995

Schulischer und beruflicher Werdegang

1970 – 1974:	Grundschule in Hannover
1974 – 1976:	Realschule in Hannover
1976 – 1983:	Gymnasium in Hannover
1983 – 1989:	Universität Hannover: Diplom-Studiengang Biologie
1988 – 1989:	Diplomarbeit im Institut für Med. Mikrobiologie der MHH Prof. Bitter-Suermann, AG Prof. Frosch. Thema: *„Molekulargenetische Analyse des Kapselpoly-saccharidtransports von Meningokokken der Serogruppe B“*
1989 – 1991:	Ludwig-Maximilians-Universität München: Studium des Höheren Lehramtes für Biologie und Chemie Wissenschaftliche Mitarbeit am Lehrstuhl für Angewandte Zoologie, Prof. Schopf; Projekt: *Energiestoffwechsel von Ips typographus L.*
1991 – 1994:	Universität Hannover: Studium des Höheren Lehramtes für Biologie und Chemie
6/1994:	1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien
1994 – 1997:	Pause wegen Kindererziehung
2/1997 – 2/1998:	Medizinische Hochschule Hannover, Abt. Rheumatologie Prof. Zeidler, AG PD Dr. Köhler: Beschäftigungsverhältnis im Rahmen der Förderung des Hochschulsonderprogramms II
seit 3/1998:	Promotionsarbeit: *„Mechanismen der Persistenz von Chlamydia trachomatis und Chlamydophila pneumoniae in humanen monozytären und epithelialen Zellen“*

Hannover, den 01.10.2003

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Zeidler bedanken, der mir nicht nur die Anfertigung der vorliegenden Arbeit in der Abt. Rheumatologie ermöglichte, sondern mich auch mit wertvollen Anregungen und konstruktivem Rat begleitet hat.
Die während der Schlussphase dieser Arbeit aufgetretenen kleinen und großen Probleme wurden durch die Mithilfe von Herrn Prof. Müller gelöst. Für seine freundliche und unkomplizierte Unterstützung und die Übernahme des Referates dieser Arbeit möchte ich mich sehr herzlich bedanken.
Herrn PD Dr. Lars Köhler bin ich sehr dankbar für die Betreuung der Arbeit, die konstruktiven Vorschläge und Diskussionen und seinen klaren Blick für die Umsetzbarkeit meiner Ideen.
Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jens Kuipers für seinen vollen Einsatz beim Korrekturlesen bis zur letzten Minute.

Eva Nettelnbreker habe ich es zu verdanken, überhaupt in der Abteilung Rheumatologie meine Arbeit aufgenommen zu haben.
Bedanken möchte ich mich herzlich bei Julia Freise unter anderem für ihre Hilfe in organisatorischen und sprachlichen Dingen, Sebastian Schnarr für seine immer schnelle und wirksame Hilfe (wenn ich mich mit dem PC mal wieder nicht verstand) und Birgit Hartmann, Ute Dreses-Werringloer und Nicole Wagener für die guten Gespräche und Tipps, auch nach dem Verlassen der Abteilung.

Allen Mitarbeitern des Labors ein großes „Dankeschön“ für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und eine schöne Zeit.
Für vielfache praktische Unterstützung danke ich insbesondere Cornelia Schmidt, Anke Bialowons, Ulla Fendrich und Barbara Jürgens-Saathoff.
Karin Battmer aus der Abt. Hämatologie und Onkologie danke ich für viele kleine und große Hilfen und Tipps im Labor, immer wenn es mal wieder irgendein Problem gab.

Ein Danke auch für die vielfach gewährte Hilfe anderer Arbeitsgruppen:
Herr Prof. M. Maaß und Frau Harig von der Medizinischen Universität Lübeck haben mich in die Arbeiten mit *Chlamydophila pneumoniae* eingeführt. Von Herrn Prof. Däubener und PD Dr. C. MacKenzie (Universität Düsseldorf) habe ich den IDO-Hemmer 6-CDLT erhalten und im Labor von Herrn PD Dr. Th. Höhler der Universität Mainz haben Frau Schank und Frau Süßdorf die Durchführung der Zytokin-ELISAs übernommen.

Stefan Marienfeld danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder.

Meiner lieben Freundin Monica Winkler danke ich herzlich für tausend und ein Gespräch mit oder ohne Salat über die Arbeit und nicht über die Arbeit und für ihre kritische und konstruktive Begleitung.

Meinen Eltern Elfriede und Hans-Oskar Krauße gilt mein ganz besonders herzlicher Dank für Ihre immerwährende Unterstützung, für die aufbauenden Gespräche und für die Betreuung von Lea und Saskia, nicht nur wenn es im Labor mal wieder „brannte“. Auch meine Schwester Annette Krauße war oft die „Kinder-Feuerwehr“ und hat mir immer wieder den Rücken gestärkt.

Ganz herzlich danke ich meinen Töchtern Lea und Saskia, weil sie mich immer unterstützt und alle meine harten Arbeitsphasen mit großem liebevollen Verständnis begleitet haben.

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel, sowie die zu Dienstleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, im Oktober 2003

(Birgit Kraußе-Opatz)